



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Νίκος Σακελλαρίδης

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ**  
**ΚΙΝΑΣΗΣ C έψιλον ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΜΝΗΜΗΣ**  
**ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ ΜΕ ΠΟΖΙΤΡΟΝΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ**

**ΟΛΓΑ ΑΣΗΜΑΚΗ**  
**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΘΕΣΣΑΛΙΑ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C  
έψιλον ΕΠΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΜΝΗΜΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ ΜΕ  
ΠΟΖΙΤΡΟΝΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ:  
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ  
ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ**

**ΟΛΓΑ ΑΣΗΜΑΚΗ**  
**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ  
  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΝΕΥΡΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΘΕΣΣΑΛΙΑ 2011

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

- Νίκος Σακελλαρίδης, MD, PhD  
Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
  
- Δήμητρα Μάγκουρα, MD, PhD  
Καθηγήτρια- Ερευνήτρια Α'  
Διευθύντρια του Κέντρου Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
  
- Νικόλαος Πιτσίκας, PhD  
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Νίκος Σακελλαρίδης, MD, PhD  
Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δήμητρα Μάγκουρα, MD, PhD  
Καθηγήτρια- Ερευνήτρια Α'  
Διευθύντρια του Κέντρου Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
- Νικόλαος Πιτσίκας, PhD  
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Άννα Βασιλάκη, PhD  
Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παναγιώτης Λιάκος, PhD  
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Γεώργιος Κουκούλης, MD, PhD  
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας- Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Γεώργιος Νταλέκος, MD, PhD  
Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Αφιερωμένο στους γονείς μου και  
στο σύζυγό μου που στάθηκαν δίπλα μου...

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>10</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>14</b>
1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	14
1.2. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ .....	18
1.2.1. Φυτοκανναβινοειδή, συνθετικά κανναβινοειδή και οι υποδοχείς τους .....	18
1.2.2. Ενδοκανναβινοειδή .....	23
1.2.3. Κατανομή των υποδοχέων των κανναβινοειδών στο νευρικό σύστημα .....	24
1.3. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΝΣ .....	28
1.3.1. Επίδραση των κανναβινοειδών στη νευρική ανάπτυξη και τη συναπτική δραστηριότητα .....	28
1.3.2. Επίδραση των κανναβινοειδών σε λειτουργίες του ΚΝΣ .....	31
1.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ CB1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ .....	37
1.4.1. CBRs: Υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) .....	37
1.4.2. Ρύθμιση κλασσικών οδών μεταγωγής σήματος.....	41
1.4.3. Μεταγωγή σήματος μέσω της ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK).....	44
1.4.4. Αλληλεπίδραση CB1 υποδοχέων με υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) και συντονισμός της σηματοδότησης στις λιπιδικές σχεδίες .....	47
1.5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ERK-MAPK ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ CB1R ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	50
1.6. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ C (PKC) .....	53
1.6.1. Οικογένεια Πρωτεϊνικών Κινάσεων C: Ενεργοποίηση και λειτουργία.....	54
1.6.2. Συμμετοχή της PKCε ισομορφής σε προσυναπτικές και γνωσιακές λειτουργίες .....	57
1.7. ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΠΟΖΙΤΡΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗ .....	59
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>62</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>63</b>
2.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΡΕΤ/CT .....	63
2.1.1. Πειραματόζωα.....	63
2.1.2. Χορήγηση αγωνιστών και ανταγωνιστών των κανναβινοειδών.....	63
2.1.3. Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων (Object recognition task).....	64

2.1.4.	Λήψη εικόνων PET/CT.....	65
2.2.	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	66
2.2.1.	Πλασμίδια .....	66
2.2.2.	Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών στη εισαγωγή πλασμιδιακού DNA .....	66
2.2.3.	Μετασχηματισμός καλλιέργειών E.Coli.....	67
2.2.4.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων .....	67
2.2.5.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA.....	70
2.2.6.	Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	70
2.2.7.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης .....	70
2.3.	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	71
2.3.1.	Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Νευρώνων.....	71
2.3.2.	Καλλιέργεια Ευκαριωτικών Κυττάρων .....	72
2.3.3.	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων.....	73
2.3.4.	Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων SH-SY5Y-CB1R.....	74
2.3.5.	Χορήγηση αγωνιστών, ανταγωνιστών και αναστολέων .....	74
2.4.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA .....	76
2.4.1.	Απομόνωση ολικού RNA από ευκαριωτικά κύτταρα.....	76
2.4.2.	Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) .....	76
2.4.3.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	77
2.5.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	78
2.5.1.	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών και ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών.....	78
2.5.2.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	79
2.5.3.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	80
2.5.4.	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot) .....	81
2.5.5.	Δοκιμασία Δραστηριότητας Ras (RBD pull down assay) .....	83
2.5.6.	Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών ηλεκτροφόρησης .....	85
2.5.7.	Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού .....	86
2.6.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ «ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ».....	87
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>88</b>
3.1.	ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΡΕΤ ΣΤΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΠΙΜΥ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΝΗΜΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΡΑΣΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ .....	88
3.2.	ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ CB1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	91

3.2.1. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του CB1R σε φλοιϊκούς νευρώνες νεοσσού όρνιθας σχετιζόμενα με νευριτική ανάπτυξη .....	91
3.2.2. Δημιουργία κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος SH-SY5Y που υπερεκφράζει σταθερά τον EGFP-CB1R (SH-SY5Y-CB1R).....	93
3.3. Ο CB1R ΕΠΑΓΕΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΜΕΣΩ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ Gq/11/PLC/PKCε ΚΑΙ Gi/SRC-FYN ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	95
3.3.1. Δοσοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση της ERK από τον CB1R και κορύφωση της ενεργοποίησής της σε δύο χρονικά σημεία σε φλοιϊκούς νευρώνες .....	95
3.3.2. Ενεργοποίηση της ERK από τον CB1R μέσω ηPKC και της οικογένειας Src κινασών τυροσίνης.....	96
3.3.3. Ενεργοποίηση της PKCε από τον CB1R άνωθεν των Src και Fyn.....	99
3.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ CB1R-PKCε ΚΑΙ PKCε-Src/Fyn ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ CB1R ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	106
3.4.1. (Προ)σύνδεση του CB1R με τη ρυθμιστική περιοχή της PKCε και αποσύνδεση μετά από πρόσδεση αγωνιστή .....	106
3.4.2. Σύνδεση της ενεργοποιημένης PKCε με τις Src και Fyn .....	108
3.5. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΑΠΟ ΤΟΝ CB1R ΜΕΣΩ PKCε-Src/Fyn-Ras-Raf ΚΑΙ ΔΙΑΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ EGFR ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y-CB1R.....	110
3.5.1. Ενεργοποίηση της ERK από τον CB1R κατά τρόπο διφασικό μέσω PKCε και Src/Fyn στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα.....	110
3.5.2. Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras και Raf από τον CB1R μέσω διενεργοποίησης του EGFR .....	113
3.5.3. Επιστράτευση των CB1 και EGF υποδοχέων στις λιπιδικές σχεδίες μετά από ενεργοποίηση με κανναβινοειδή.....	116
3.6. Ο CB1R ΕΠΑΓΕΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΜΕΣΩ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ FGFR ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	119
3.6.1. Διενεργοποίηση του FGFR από τον CB1R επάγει ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK μέσω των PKCε, Src & Fyn σε πρωτογενείς νευρώνες .....	119
3.6.2. Σχηματισμός πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων του CB1R με τις Src/Fyn κινάσες και τον FGFR .....	123

3.6.3. Η ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδίων ως απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό των CB1R σηματοδοτικών συμπλόκων στους E7 νευρώνες..	126
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>130</b>
4.1. Ο CB1 υποδοχέας επάγει διφασική ενεργοποίηση της ERK μέσω σχηματισμού πολυπρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων με τις εγγύς κινάσες PKCε, Src και Fyn.....	132
4.2. Η εξαρτώμενη από τον CB1R διενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTK) πηγάζει από τις λιπιδικές σχεδίες και επάγει ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK1/2.....	138
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>143</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>144</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>145</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....</b>	<b>169</b>

---

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) κατά τη χρονική περίοδο 01/2006-01/2011. Εκπονήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 με τίτλο «Διεπιστημονική μελέτη της PKCε σε νευροβλάστες και νευρώνες: έκφραση, ρύθμιση δραστηριότητας και συμμετοχή στο μηχανισμό διαφοροποίησης και στη λειτουργία των κυκλωμάτων μνήμης» και επιστημονική υπεύθυνη τη Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα. Το έργο πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Βασικών Επιστημών του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Νίκου Σακελλαρίδη.

Από τη θέση αυτή, και με την ολοκλήρωση της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνετέλεσαν στην υλοποίησή της. Καταρχήν οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιστημονική υπεύθυνη του έργου Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε από το ξεκίνημα της εργασίας με την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης και την ευκαιρία που μου χάρισε να διευρύνω τα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα. Την ευχαριστώ για το χρόνο που μου αφιέρωσε τα τελευταία πέντε χρόνια προσφέροντάς μου την πολύτιμη διδασκαλία και τη βαθειά της γνώση στο επιστημονικό αντικείμενο, εφόδια ανεκτίμητα χωρίς τα οποία δε θα είχε γίνει πραγματικότητα η εκπόνηση αυτής της μελέτης. Η υποστήριξη, η καθοδήγηση και η ενθάρρυνση της Δρ. Μάγκουρα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, ήταν καθοριστικής σημασίας στην επιστημονική μου εξέλιξη.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Νίκο Σακελλαρίδη για την επίβλεψη της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ που με τη θέληση και την καλή του διάθεση δεν επέτρεψε ποτέ στην απόσταση να σταθεί εμπόδιο στη συνεργασία μας, και συνέβαλε ουσιαστικά στην εκπόνηση και συγγραφή της εργασίας αυτής με τις πολύτιμες ιδέες, τις επιστημονικές συμβουλές και τις εύστοχες υποδείξεις του.

Εκφράζω, επίσης, τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Πιτσικά για τις παρατηρήσεις του και τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που έλαβα από μέρους του όταν όλες οι δυσκολίες της αρχής μου φάνταζαν ανυπέρβλητα εμπόδια. Επίσης, ευχαριστώ θερμά για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους όλα τα μέλη

της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τις πολύτιμες φίλες και, επίσης, υποψήφιες διδάκτορες Ξένια Κολιού και Σοφία Καρουζάκη για την άριστη συνεργασία μας καθόλη τη διάρκεια του προγράμματος. Μαζί βιώσαμε και μοιραστήκαμε όλες τις έντονες, ευχάριστες και δυσάρεστες, στιγμές κατά την παράλληλη διεξαγωγή των διατριβών μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας και συγκεκριμένα στον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Φαιδωνίδη, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Θεοδώρα Καλπαχίδου και στο φοιτητή Γιάννη Λόη για την πολύπλευρη συμπαράσταση και βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, την υποψήφια διδάκτορα Στυλιανή Ζησοπούλου για τη στήριξη που μου προσέφερε στο ξεκίνημα της διατριβής αυτής.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τον Ευθύμη Παρώνη, μέλος της Μονάδας Ζωϊκών Προτύπων του Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του ΙΙΒΕΑΑ για την ανεκτίμητη βοήθειά του, καθώς και τον Ηλία Βαλιάκο, υποψήφιο διδάκτορα του τομέα Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συνεργασία του και την ευγενική παραχώρηση αδημοσίετου υλικού ιστορικού περιεχομένου. Επίσης, τη διευθύντρια του Κέντρου Πυρηνικής Ιατρικής του ΙΙΒΕΑΑ Δρ. Σοφία Χατζηιωάννου και το Λαέρτη Παπασπύρου για τη βοήθεια και το χρόνο που διέθεσαν προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα στο PET.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Δρ. Γ. Λεονταρίτη τόσο για τις πολύτιμες υποδείξεις και την αμέριστη βοήθειά του σε επιστημονικό επίπεδο όσο και για την ηθική του υποστήριξη σε όλη την πορεία της διατριβής. Το αμείωτο ενδιαφέρον του στάθηκε για εμένα πολύτιμος σύμμαχος για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου Νίκη και Παναγιώτη και στο σύζυγό μου Κώστα για την ηθική συμπαράσταση αλλά και την υπομονή που έδειξαν έως ότου ολοκληρώσω το στόχο μου. Επίσης, ευχαριστώ τη στενή μου φίλη Σεβαστιάνα Καθοπούλη για την πολύπλευρη στήριξή της στις δύσκολες στιγμές.

Όλγα Ασημάκη,  
Φεβρουάριος 2011

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

2-AG:	2-αραχιδονοϋλγλυκερόλη (2-arachidonoylglycerol)
2-AGE:	Νολαδινικός αιθέρας (2-Arachidonyl glyceryl ether)
AC:	αδενυλική κυκλάση (Adenylyl cyclase)
AP:	Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline phosphatase)
aPKCs:	Άτυπες ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Atypical PKCs)
APS:	Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)
AEA:	Ανανδαμίδα (Anandamide)
BDNF:	Εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (Brain-derived neurotrophic factor)
BSA:	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin)
cAMP:	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Cyclic adenosine monophosphate)
CAT:	Καταλυτική περιοχή (Catalytic domain)
CB1R:	Υποδοχέας 1 των κανναβινοειδών (Cannabinoid receptors 1)
CB2R:	Υποδοχέας 2 των κανναβινοειδών (Cannabinoid receptors 2)
CBD:	Κανναβιδιόλη (Cannabidiol)
CBN:	Κανναβινόλη (Cannabinol)
CBR:	Υποδοχέας των κανναβινοειδών (Cannabinoid receptors)
CCK:	Χολυκυστοκίνη (Cholecystokinin)
cDNA:	Συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA)
CHO cells:	Κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ (Chinese hamster ovary)
CNS, ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα (Central nervous system)
cPKCs:	Κλασσικές ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Classical PKCs)
CT:	Αξονική τομογραφία (Computerized tomography)
C-terminus:	Καρβοξυλικό άκρο (Carboxyl-terminus)
DAG:	Διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol)
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO:	Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (Dimethyl sulfoxide)
DNA:	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic acid)



DSE:	Προκληθείσα από αποπόλωση καταστολή της διέγερσης (Depolarization-induced suppression of excitation)
DSI:	Προκληθείσα από αποπόλωση καταστολή της παρεμπόδισης (Depolarization-induced suppression of inhibition)
DSP:	anti-dentin sialoprotein
DTT:	Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol)
ECL:	Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Enhanced Chemiluminescence)
EDTA:	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediamine tetraacetic acid)
EGFR:	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal growth factor receptor)
EGTA:	Δις-(β-αμινοαιθυλαιθερο)-αιθυλενο- γλυκολο-N,N',N'-τετραοξικό οξύ (Ethylene glycol tetraacetic acid)
ERK1/2:	Ρυθμιζόμενες από εξωκυτάρια σήματα κινάσες (Extracellular signal-regulated ERK1/2)
EtBr:	Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide)
F18-FDG:	Fluorine 18-Fluorodeoxyglucose
FAAH:	Υδρολάση λιπαρών οξέων (Fatty acid amide hydrolase)
FAK:	Κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal adhesion kinase)
FBS:	Ορός εμβρύου βοός (Fetal bovine serum)
FGFR:	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast growth factor receptor)
FRS:	FGFR substrate
GABA:	Γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (γ-Aminobutyric acid)
GAP-43:	Αυξητική συσχετιζόμενη πρωτεΐνη 43 (Growth associated protein 43 )
GDP:	Διφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine diphosphate)
GEF:	Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτίδας γουανίνης (Guanine nucleotide exchange factor)
GFP:	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein)
GIRKs:	Δίαυλοι καλίου εσωτερικής ανόρθωσης συζευγμένοι με G πρωτεΐνες
GPCRs:	Υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptors)
GST:	Μεταφοράση του γλουταθείου (Glutathione S-transferase)
GTP:	Τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine triphosphate)
HBSS:	Hank's Buffered Salt Solution
HEK293:	Ανθρώπινα νεφρικά εμβρυικά κύτταρα (Human embryonic kidney 293 cells)

IGF1:	Υποδοχέας ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (Insulin-like growth factor 1)
IP:	Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation)
IP <sub>3</sub> :	Τριφωσφορική ινοσιτόλη (Inositol triphosphate)
IPTG:	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (Isopropyl-β-D-thiogalactoside)
JNK:	Jun N-terminal Kinase
LTD:	Μακροχρόνια αποδυνάμωση (Long-term depression)
LTP:	Μακροχρόνια ενδυνάμωση (Long-term potentiation)
MAPK:	Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (Mitogen-activated protein kinase)
MARCKS:	Υπόστρωμα γ-κινασών πλούσιο σε αλανίνη (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)
mRNA:	Αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊνικό οξύ (Messenger ribonucleic acid)
MβCD:	Μεθυλικό βήτα κυκλοδεξτρίνη (Methyl-beta-cyclodextrin)
NGF:	Νευριτικός αυξητικός παράγοντας (Nerve growth factor)
NF-kB:	Πυρηνικός παράγοντας kB (Nuclear factor kB)
NMDA:	N-μεθυλ-δ-ασπαρτικό οξύ (N-Methyl-D-aspartic acid )
nPKCs:	Νεοφανείς ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Novel PKCs)
N-terminal:	Αμινοτελικό άκρο (Amino-terminus)
PAGE:	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate buffered saline)
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
PDGF:	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπετα λίων (Platelet-derived growth factor)
PET:	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron emission tomography)
PFA:	Παραφολμαδεΰδη (Paraformaldehyde)
PI3K:	Κινάση 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphoinositide 3 kinase )
PKA:	Πρωτεϊνική κινάση A (Protein kinase A)
PKB:	Πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B)
PKC:	Πρωτεϊνική κινάση C (Protein kinase C)
PLC:	Φωσφολιπάση C (Phospholipase C)
PLD:	Φωσφολιπάση D (Phospholipase D)

PMSF:	Φθοριούχος μεθανοσουλφονικός φαινυλεστέρας (Phenylmethanesulphonyl fluoride)
ΠΝΣ, PNS:	Περιφερικό νευρικό σύστημα (Peripheral nervous system)
PTX:	Τοξίνη του κοκκύτη (Pertussis toxin)
p-Tyr:	Φωσφοτυροσίνη (Phosphotyrosine)
R(+)-MA:	Μεθανανδαμίδα (Methanandamide)
RACK:	Υποδοχέας για ενεργοποιημένη κινάση C (Receptor for activated protein kinase C)
RBD:	Θέση πρόσδεσης της Ras (Ras binding domain)
REG:	Ρυθμιστική περιοχή (Regulatory domain)
RTKs:	Υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης (Receptor tyrosine kinases)
RT-PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase PCR)
SDS:	Θειικό δωδεκανοϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)
TBST:	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει Triton X-100 (Tris buffered saline-Triton X-100)
TEMED:	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
THC:	Τετραϋδροκανναβινόλη (Tetrahydrocannabinol)
Tris:	Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο (Hydroxymethyl)aminomethane)
TrkB:	Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης B (Tyrosine Kinase Receptor B)
VEGFR:	Υποδοχέας αγγειακού επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Vascular growth factor receptor)
εV1-2:	Specific PKCe inhibitor peptide CYGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub> (TAT) \S-S/ EAVSLKPT
ψεRACK:	Specific PKCe activator peptide CYGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub> (TAT) \SS/ CHDAPIGYD -COOH



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

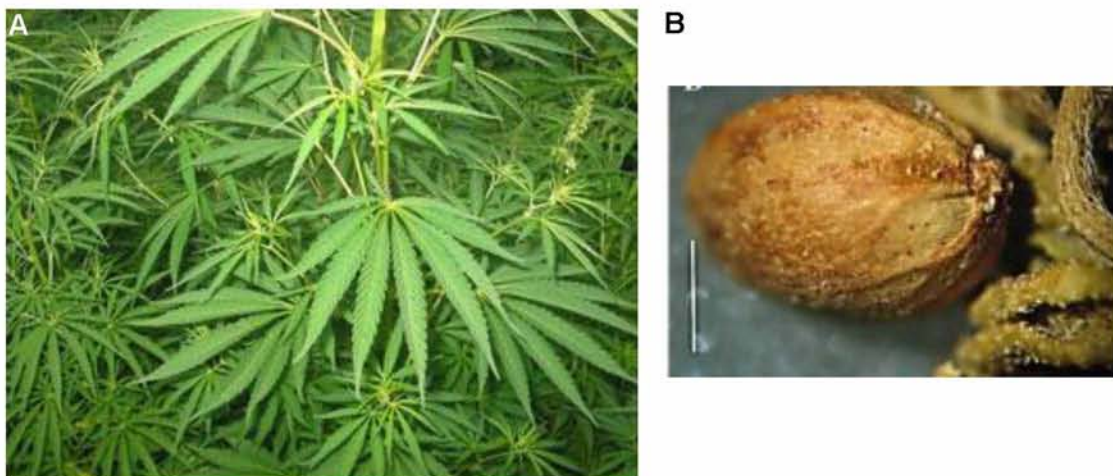
### 1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο όρος «κάνναβη» ή «κάνναβις» είναι πιθανότατα σημιτικής προέλευσης και αναφέρεται στα διάφορα ψυχοδραστικά σκευάσματα (φύλλα μαριχουάνας, χασίς και χασισέλαιο) του φυτού της κάνναβης (**Εικ.1Α**). Προέρχεται από τη σουμεριακή λέξη "kanubi" που σημαίνει «κάννα (=η κάλαμος) των δύο (φύλων)», ίσως λόγω του γεγονότος ότι η κάνναβη έχει αρσενικά και θηλυκά φυτά. Εναλλακτικά του όρου «κάνναβη» συχνά χρησιμοποιούνται οι ονομασίες ντάχα, μαύρο (κυρίως το χασίς), βρομά, φούντα, νταφού, τσούρου, πράσο, λαλάκι γρασίδι, χόρτο, ντουμάνι, μπουρούχα κ.α, ενώ ο όρος μπάφος αναφέρεται στο τσιγάρο που στρίβεται με κάνναβη και καπνό. Πρόκειται για ένα θαμνώδες φυτό που διακρίνεται για τη μεγάλη ικανότητα προσαρμογής του σε διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες. Η κάνναβη είναι φυτό του γένους των κνιδωδών, περιλαμβάνει ένα μόνο είδος, την Κάνναβη την ήμερη (*Cannabis Sativa*) και υπάρχει στη φύση σε περισσότερες από εκατό παραλλαγές. Ο μεγάλος αριθμός των ποικιλιών αυτού του φυτού, που ταξινομήθηκε από τον Linneaus το 1753 στο βιβλίο του *Species Plantarum* με το όνομα *Cannabis Sativa*, δημιούργησε στο παρελθόν πολλές διαφωνίες μεταξύ των βοτανολόγων σχετικά με την ακριβή ταξινόμησή του, αλλά σήμερα έχει γίνει δεκτό ότι το γένος της κάνναβης ανήκει στην οικογένεια των Κανναβοειδών (*Cannabaceae*) και υπάρχει ένα αρχικό είδος, η *Cannabis Sativa*, από το οποίο προέκυψαν πολλές παραλλαγές, όπως η *Cannabis Indica* (ινδική κάνναβη) και *Cannabis Ruderalis* που διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς την περιεκτικότητά τους σε ορισμένες δραστικές ουσίες. Για παράδειγμα, η *C. Sativa* από την οποία παράγεται η μαριχουάνα περιέχει, σε σχέση με την ινδική κάνναβη, υψηλότερα επίπεδα  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης ( $\Delta^9$ -THC), στην οποία και οφείλονται οι ψυχοδιεγερτικές δράσεις της κάνναβης, και ελάχιστη από τη μη ψυχοδραστική κανναβιδιόλη (CBD). Αντίθετα, από την ποικιλία της ινδικής κάνναβης που περιέχει μέτρια επίπεδα  $\Delta^9$ -THC και υψηλά επίπεδα της μη ψυχοδραστικής CBD, προέρχεται το χασίς.

Η καταγωγή της *C. Sativa* (**Εικ.1Α**) τοποθετείται στις ορεινές περιοχές της Βόρειας Ινδίας (σημερινό Πακιστάν), αλλά η προσαρμοστικότητα του φυτού σε όλες σχεδόν τις συνθήκες τη διέδωσε εύκολα σε όλο τον κόσμο. Διαφορετικοί πολιτισμοί έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιήσει την κάνναβη με διάφορους σκοπούς (**Εικ.2**). Τα φυτά αυτά καλλιεργούνται από την αρχαιότητα, και μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται τόσο για τις ίνες τους (κατασκευή σχοινιών και υφασμάτων), όσο και για φαρμακευτικούς

σκοπούς, εφόσον οι ίνες τους περιέχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες μιας μεγάλης οικογένειας ενώσεων, γνωστών ως κανναβινοειδή (cannabinoids) που χαρακτηρίζονται από ισχυρή καταπραϋντική δράση. Ανασκαφές στην Ταϊβάν αποκάλυψαν ότι το φυτό της κάνναβης είχε αρχίσει να καλλιεργείται 3.000 χρόνια προ Χριστού, ενώ έφτασε στην Ευρώπη το 1500 π.Χ. Η μαριχουάνα χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια ως παυσίπονο και η αρχαιότερη αναφορά στις θεραπευτικές χρήσεις της κάνναβης βρίσκεται στην κινέζικη σύνοψη των φαρμάκων (Βοτανοθεραπευτική) του αυτοκράτορα Shen Nung, που χρονολογείται από το 2737 π.Χ., η οποία τη συνιστά ως φάρμακο κατάλληλο για μεγάλο αριθμό δυσλειτουργιών και ασθενειών. Πολλοί μελετητές υποστηρίζουν ότι οι Ισραηλίτες της βιβλικής περιόδου έκαναν εκτεταμένη χρήση κάνναβης, θεωρώντας ότι αυτή υπονοείται σε δυο τουλάχιστον χωρία της Παλαιάς Διαθήκης, όπως στο Άσμα Ασμάτων, 5:1 και Σαμουήλ, 14:25-45 [1].

Σε πρόσφατες ανασκαφές του 2008 στην περιοχή Τιγραν της κεντρικής Κίνας οι ερευνητές ανακάλυψαν τους αρχαιότερους βλαστούς μαριχουάνας (**Εικ.1B**). Πρόκειται για 789 γραμμάρια αποξηραμένης κάνναβης που υπολογίζονται να είναι 2700 ετών και βρέθηκαν φυλαγμένα μέσα σε ξύλινο δοχείο σε κρύπτη που ανακαλύφθηκε στον τάφο ενός ιερέα. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν την αρχαιότερη αναφορά καλλιέργειας της κάνναβης για τις ψυχοδραστικές της επενέργειες και όχι για ρουχισμό, καθώς πιθανά συμπεριλήφθηκε στον τάφο για χρήση κατά τη μεταθανάτιο ζωή [2].



**Εικόνα 1.** (Α) Το φυτό Cannabis Sativa από το οποίο εξάγονται 66 κανναβινοειδή και (Β) ο καρπός της κάνναβης από το υλικό που βρέθηκε φυλαγμένο στην αρχαία κρύπτη και η ηλικία του εκτιμάται στα 2700 χρόνια. Μικροσκοπία αποκάλυψε ότι ο 2700 ετών καρπός της κάνναβης παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την κάνναβη που καλλιεργείται στις μέρες μας (scale bar: 1 mm) [2].



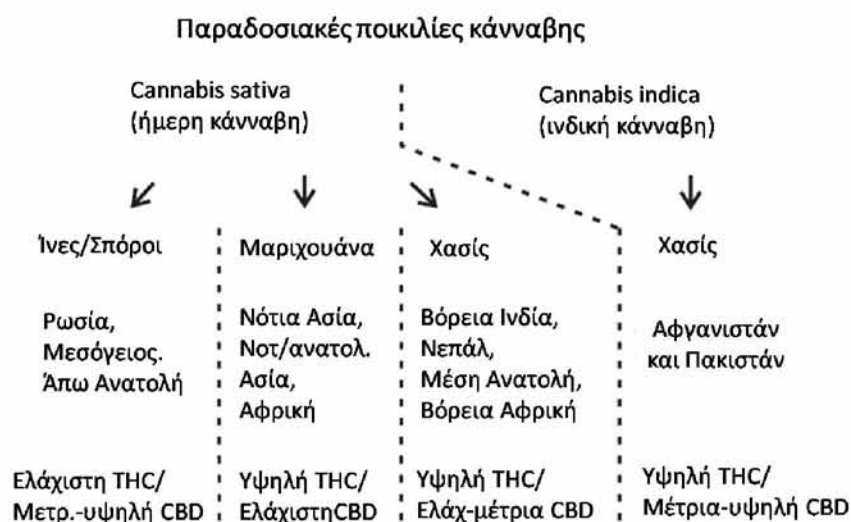
Η εμφάνιση και η διάδοση της χρήσεως της κάνναβης στην Ευρώπη τοποθετείται το 18<sup>ο</sup> αιώνα και αρχικά η *C.Sativa* χρησιμοποιήθηκε για ανακούφιση από τα συμπτώματα ποικίλων ψυχιατρικών διαταραχών σχετιζόμενων με άγχος όπως μανία, υστερία, υδροφοβία και παραλήρημα [3]. Το 19<sup>ο</sup> αιώνα, η μαριχουάνα ήταν μια δημοφιλής θεραπεία για τους πονοκεφάλους, τον πονόδοντο και τη στομαχαλγία, ενώ στα επόμενα χρόνια ακολούθησαν χιλιάδες επιστημονικές δημοσιεύσεις σχετικά με τα ιατρικά οφέλη της.

Στη χώρα μας, η κάνναβη καλλιεργούνταν για αιώνες για την παραγωγή σκονιών και υφασμάτων και μέχρι τα μέσα ακόμη του 20ού αιώνα αποτελούσε βασική γεωργική καλλιέργεια και εξαγωγίμο προϊόν. Η πρώτη αναφορά μάλιστα σε αυτήν συναντάται το 450 π.Χ. στον Ηρόδοτο που περιγράφει τους Σκύθες της κεντρικής Ασίας, οι οποίοι έκαigan το φυτό και η οσμή που αναδύοταν ήταν πολύ ευχάριστη, προκαλούσε δε τη μέθη. Οι Έλληνες και Ρωμαίοι γιατροί γνώριζαν από τον πρώτο αιώνα μ.Χ. τη *C.Sativa* και τις φαρμακευτικές της ιδιότητες όταν ο Πεδάνιος Διοσκορίδης, θεμελιωτής της φαρμακολογίας, συμπεριέλαβε το φυτό στο περίφημο σύγγραμμά του «Περί Ύλης Ιατρικής» (*Materia Medica*) ανάμεσα στα φυτά με φαρμακευτικές ιδιότητες. Τους αιώνες που ακολούθησαν πολλοί συγγραφείς ανάμεσά τους και ο Αλέξανδρος Τραλλιανός, χρησιμοποιούσαν το όπιο εναλλακτικά της κάνναβης για φαρμακευτικούς σκοπούς, ενώ η επόμενη αναφορά στις φαρμακευτικές ιδιότητες της κάνναβης εμφανίζεται το 13<sup>ο</sup> αιώνα από το Νικόλαο Μυρεψό, γιατρό της αυλής του αυτοκράτορα της Αλεξάνδρειας. Στο έργο του «Δυναμερόν» που παραμένει ακόμη ανέκδοτο, ο Νικόλαος Μυρεψός περιλαμβάνει 2656 ιατρικές συνταγές, καταγράφει πρώτες ύλες, παρασκευαστικές μεθόδους, μορφές χορηγήσεων, δοσολογικά σχήματα και υποκατάστατα. Αυτό το βιβλίο αποτέλεσε μέχρι και το 18ο αιώνα το επίσημο φαρμακευτικό κώδικα της Δύσης και το επίσημο σύγγραμμα της ιατρικής σχολής του Παρισιού. Στο πρώτο κεφάλαιο του «Δυναμερόν» με τίτλο «Περί Αντίδοτον» παρατίθεται μία συνταγή που περιέχει ως ένα από τα συστατικά της την «καναβηναίαν» και χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, σαν αντίδοτο στη μανία και την υστερία, καθώς κατά το συγγραφέα οφελεί “τους παραλυτικούς και τους αφρίζοντας και δαιμονιούντας”. Στη συνέχεια παραθέτουμε από το πρωτότυπο κείμενο του Ν. Μυρεψού τη συνταγή όπου γίνεται αναφορά της κάνναβης ως συστατικό με θεραπευτικές ιδιότητες:

«σζη' Αντίδοτος τὸ ἄφραστον τὸ τοιοῦτον ὠφελεῖ, εἰς παραλυτικοῖς καὶ εἰς ἀφρίζοντας καὶ δαιμονιοῦντας ἔχει:-

Σκορδοράσαρον ἁμωνιακὸν σμύρνης δραγαγάντην ὀποπάνακος σεραπιώνι καστόριν σίδηρόστουπον χαλβάνην ἄσφαλον δρακόντιον αἶμα μώρρα λιβάνου μαστίχην ταῦτα ὅλα, ἀνὰ δραμ α', τὰ δὲ ἀρωματικᾶ τὰ μὴ τριβώμενα, ἐξάφρισον ἐν ποτήριον, μελίζεσθαι καὶ ἐπίθες αὐτᾶ, ἐν αὐτῷ καὶ κύνει ἰσχυρὸς ἐν ὀλμῷ τὰ δὲ ἕτερα ἴδη, τρίψον καὶ κοσκίνησον καὶ μετὰ ταῦτα, θές τα τοιαῦτα βότανα οἶον ὕσσωπον βεττόνικα, **καναβηναίαν** ἐλελίσφακον κυνὸγλωσσον πήγανον κνίδην ἔρικαν φοῦ καλαμύνθην μικρὸν βοῦλβακαν, σοῦλφαρα τρίψον οἶνου [63v] τὰ βότανα ταῦτα καὶ βάλλε ἐν ἀγγεῖῳ, μετὰ ἀκράτου οἶνου καὶ θές εἰς τὰ ἄστρα, μετὰ σιδήρου, καὶ δὸς τῷ νοσοῦντι» (Νικόλαος Μυρεψός, Δυναμερόν, Περί ἀντίδοτον [1] σζη).

Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα επισημαίνονται οι επικίνδυνες δράσεις της κάνναβης και διατυπώνεται η άποψη ότι αποτελεί ουσία που προκαλεί εξάρτηση, γι' αυτό και η κατανάλωσή της πρέπει να θεωρηθεί παράνομη. Η απαγόρευση της κάνναβης άρχισε στις Η.Π.Α το 1937 και ίσχυσε πολύ γρήγορα σε όλο σχεδόν τον κόσμο. Εξαίρεση σε αυτό αποτελεί η συνταγογράφησης της σε συγκεκριμένους νόσους, όπως καρκίνος και AIDS. Παρόλα αυτά τα παράγωγά της, η μαριχουάνα και το χασίς, παραμένουν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ουσίες των δυτικών κοινωνιών, ενώ είναι ιδιαίτερα δημοφιλή σε νεαρά άτομα [4].



**Εικόνα 2.** Οι 4 παραδοσιακά βασικότερες ποικιλίες κάνναβης. Οι περισσότερες από τις σύγχρονες ποικιλίες της κάνναβης που χρησιμοποιούνται ιατρικά αποτελούν μείγμα της παραδοσιακής 'ήμερης' ποικιλίας μαριχουάνας με την 'ινδική' ποικιλία χασίς.



## 1.2. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ

### 1.2.1. Φυτοκανναβινοειδή, συνθετικά κανναβινοειδή και οι υποδοχείς τους

Πλέον γνωρίζουμε ότι οι ψυχοδιεγερτικές δράσεις της κάνναβης οφείλονται κυρίως σε ένα παράγωγο διβενζοπυρανίου, την Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC) που εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα παράνθια φύλλα του θηλυκού φυτού όπου υπάρχει πλήθος εκκριτικών αδένων, και στην πολύ λιγότερο δραστική Δ<sup>8</sup>-THC. Η Δ<sup>9</sup>-THC (Πίν.1), η οποία απομονώθηκε και συντέθηκε στο εργαστήριο του Mechoulam μόλις τη δεκαετία του 1960 [5], είναι το πιο γνωστό φυτοκανναβινοειδές και συγχρόνως η πιο διεξοδικά μελετημένη ουσία εξαιτίας της ισχύος της, αλλά και της αφθονίας της στην Cannabis Sativa.

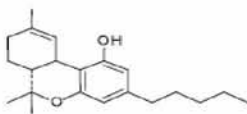
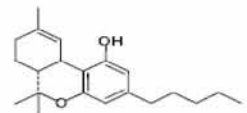
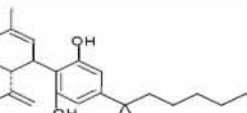
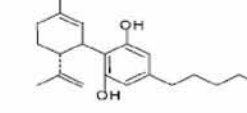
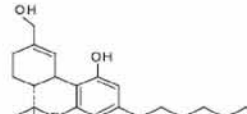
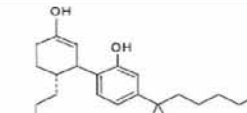
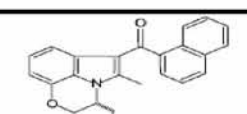
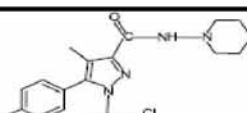
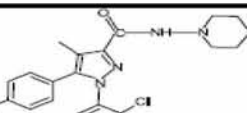
Οι φαρμακολογικές επιδράσεις της Δ<sup>9</sup>-THC ποικίλλουν ανάλογα με α. τον τρόπο χορήγησής της (η λήψη από το στόμα, για παράδειγμα, επάγει μειωμένη, αλλά περισσότερο παρατεταμένη δραστικότητα συγκριτικά με αυτή της εισπνεόμενης λήψης), β. την εμπειρία και τη ψυχολογία του χρήστη, γ. την ευπάθειά του στις επιδράσεις των ψυχοδραστικών ουσιών, και δ. το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η χρήση (setting) [6]. Η τοξίνωση με μαριχουάνα προκαλεί αλλαγές στη διάθεση και την αντίληψη, όμως αυτό που οι περισσότεροι χρήστες επιζητούν να νιώσουν αφορά το αίσθημα ευφορίας ("high") και χαλάρωσης (mellowing out) που συνοδεύει τη χρήση της. Η επίδραση αυτή περιγράφεται διαφορετική από την αντίστοιχη αίσθηση "ανεβάσματος" μετά από χρήση οπιοειδών, και ενώ ποικίλλει σύμφωνα με τη δόση, συνήθως ο καπνιστής μαριχουάνας βιώνει μια αίσθηση ευφορίας που διαρκεί για περίπου δύο ώρες [6]. Κατά τη διάρκεια αυτή παρατηρείται εξασθένιση των γνωστικών λειτουργιών, της αντίληψης, του χρόνου αντίδρασης, και της μνήμης και μάθησης. Παρατηρούνται, επίσης, ελλείμματα στο συντονισμό και τη βάρδιση, τα οποία παραμένουν για ώρες μετά το πέρας της αίσθησης ευφορίας [6]. Σε μεγαλύτερες δόσεις παράγει φαινόμενα διεύρυνσης της συνείδησης παρόμοια μ' αυτά των ψυχεδελικών ουσιών. Σε αντίθεση, όμως, με τα κατευναστικά του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως τα βαρβιτουρικά, η THC σε πάρα πολύ μεγάλες δόσεις δεν προκαλεί αναισθησία, κώμα ή θάνατο. Η Δ<sup>9</sup>-THC είναι ουσία λιποδιαλυτή και απορροφάται ταχύτατα μετά τη λήψη της. Λόγω της λιποδιαλυτότητάς της συσσωρεύεται στους λιπώδεις ιστούς από όπου και παρατηρείται επιβραδυμένη αποδέσμευση των ψυχοδραστικών συστατικών της. Στη συνέχεια, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και συγκεντρώνεται στο μεταιχμιακό σύστημα και στις



αισθητικοκινητικές δομές του εγκεφάλου. Η συγκέντρωσή της στον εγκέφαλο είναι 3-6 φορές υψηλότερη από ό,τι στο αίμα.

Επιπλέον της THC, από το φυτό της *C.Sativa* εξάγονται περίπου 66 ακόμη φυτοκανναβινοειδή, καθώς επίσης και οι χημικά παρόμοιες ουσίες κανναβινόλη (CBN) και κανναβιδιόλη (CBD) (*Πίν.1*), δύο μη ψυχοτρόπα συστατικά με αντιφλεγμονώδη και αντισπασμική δράση που δρουν σαν αναστολείς του κυτοχρώματος P450 παρατείνοντας το μεταβολισμό και, συνεπώς, το χρόνο ημίσειας ζωής και αποβολής των κανναβινοειδών [7-11]. Η κανναβινόλη, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας θεωρείται πως σχηματίζεται από την THC κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης της συγκομισμένης κάνναβης, ήταν το πρώτο φυτοκανναβινοειδές που απομονώθηκε στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Η δομή της διασαφηνίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1930 από τον R.S. Cahn [12], και συντέθηκε χημικά για πρώτη φορά το 1940 από τα εργαστήρια των R. Adams στις Η.Π.Α και Lord Todd στην Αγγλία [13]. Το δεύτερο φυτοκανναβινοειδές, η κανναβιδιόλη, που αποτελεί κύριο συστατικό του ρητινώδους εκκρίματος των αδενωτών τριχιδίων της κάνναβης, εξήχθη από την κάνναβη από τους Adams και συνεργάτες την ίδια χρονιά που συντέθηκε η κανναβινόλη, πιθανά σε συνδυασμό με το "κανναβιδιολικό οξύ". Η σύνθεση της CBD πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από το εργαστήριο του Mechoulam το 1965 σχεδόν ταυτόχρονα με τη σύνθεση της Δ<sup>9</sup>-THC [3,14]. Η CBD θεωρείται πως προστατεύει τους χρήστες κάνναβης από τις αρνητικές επιπτώσεις της THC στον εγκέφαλο, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κανναβιδιόλη έχει τη δυνατότητα να αποτελέσει μια εναλλακτική μη τοξική θεραπευτική προσέγγιση ενάντια στον καρκίνο του μαστού σε σχέση με τη χημειοθεραπεία [15-16].

Η ανακάλυψη των κανναβινοειδών που εξάγονται από το φυτό της κάνναβης οδήγησε στη δεκαετία του 1970 στην παραγωγή συνθετικών αναλόγων που δεν αποτελούνται μόνο από ενώσεις δομικά παρόμοιες με τα φυτοκανναβινοειδή, αλλά επίσης από συνθετικά ανάλογα με διαφορετικό χημικό τύπο που περιλαμβάνουν τα κλασσικά (π.χ HU-210, συντέθηκε το 1988 από την ομάδα του Mechoulam) και μη κλασσικά κανναβινοειδή (CP 55,940, συντέθηκε από τη Pfizer το 1974) και τις αμινο-αλκυλινδόλες (aminoalkylindoles, π.χ WIN 55,212-2) [17] (*Πίν.1*).

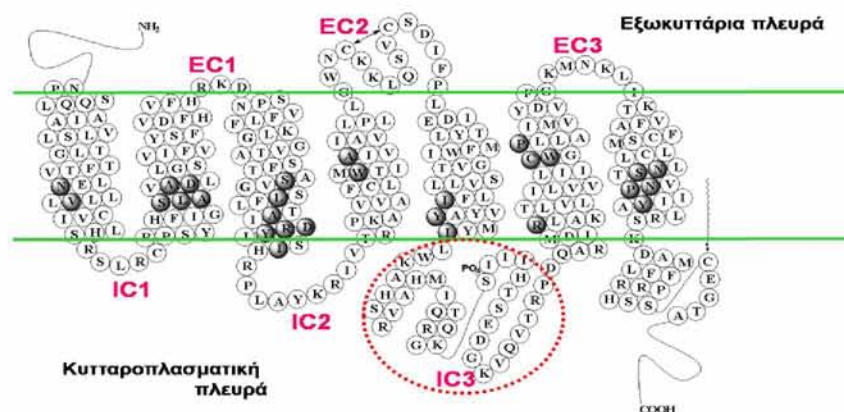
Φυτοκανναβινοειδή και τα ανάλογά τους	Συντακτικός τύπος	Δραστικότητα						
$\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC)		CB1≈CB2 αγωνιστής [18-19]						
Cannabivarol (CBV)		CB1≈CB2 ανταγωνιστής [20]						
DMH-CBD		CB1≈CB2 αγωνιστής [21]						
Κανναβιδιόλη (CBD)		Όχι δράση στο CB1 ή στο CB2 [21]						
Συνθετικά κανναβινοειδή	Συντακτικός τύπος	Δραστικότητα						
<b>Κλασσικά</b>								
(-) HU210		CB1≈CB2 αγωνιστής [18]						
<b>Μη κλασσικά</b>								
(-) CP55940 (Pfizer)		CB1≈CB2 αγωνιστής						
<b>Αμινοαλκυλινδόλες</b>								
WIN 55,212-2 (Winthrop)		CB1≈CB2 αγωνιστής						
<b>Ανταγωνιστές CBRs</b>		<b>Ki (nM) for</b>						
SR141716		<table><tr><td>CB1R</td><td>CB2R</td></tr><tr><td>1.8</td><td>514</td></tr><tr><td colspan="2">[22]</td></tr></table>	CB1R	CB2R	1.8	514	[22]	
CB1R	CB2R							
1.8	514							
[22]								
AM251		<table><tr><td>CB1R</td><td>CB2R</td></tr><tr><td>7.49</td><td>2.290</td></tr><tr><td colspan="2">[23]</td></tr></table>	CB1R	CB2R	7.49	2.290	[23]	
CB1R	CB2R							
7.49	2.290							
[23]								

**Πίνακας 1.** Συντακτικός τύπος και φαρμακολογική δραστικότητα επιλεγμένων φυτοκανναβινοειδών, συνθετικών κανναβινοειδών και ανταγωνιστών των υποδοχέων των κανναβινοειδών.

Η αίσθηση της ευφορίας και της χαλάρωσης και η στρέβλωση της οπτικής και ακουστικής αντίληψης που παράγονται από τα παράγωγα κάνναβης οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά στην εκλεκτική τους πρόσδεση σε υποδοχείς τοποθετημένους στις προσυναπτικές απολήξεις, συνδεδεμένους με πρωτεΐνες  $G_{i/o}$  ή  $G_s$  ή  $G_q$  [17]. Τόσο τα φυτοκανναβινοειδή όσο και τα συνθετικά κανναβινοειδή δρουν ως αγωνιστές του CB1 υποδοχέα των κανναβινοειδών (CB1R) [24], ο οποίος μέχρι τώρα είναι ο μόνος γνωστός υποδοχέας που εκφράζεται στον εγκέφαλο. Ο CB1R κλωνοποιήθηκε αρχικά από εγκεφαλικό φλοιό επίμου [24] και στη συνέχεια από ανθρώπινο εγκέφαλο και όρχι [25]. Ένας δεύτερος υποδοχέας για τα κανναβινοειδή, ο CB2R, που εκφράζεται πρωτίστως σε περιφερικούς ιστούς (π.χ λεμφαδένες) και κύτταρα (Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα) κυρίως στο ανοσοποιητικό σύστημα, κλωνοποιήθηκε από ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας [26]. Η THC και τα συνθετικά κανναβινοειδή αποτελούν μέχρι ενός σημείου (ανάλογα με την ένωση) και αγωνιστές του CB2R (*Πίν.1, Δραστικότητα*).

Οι CB1 και CB2 υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs), τα μέλη της οποίας διαπερνούν επτά φορές την κυτταρική μεμβράνη (7-transmembrane heptahelical receptors). Είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι υποδοχείς αυτής της υπεροικογένειας στο νευρικό σύστημα. Η θέση δέσμευσής τους από το πρόσδεμα βρίσκεται σε μία κοιλότητα που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές έλικες, και συγκεκριμένα στην τρίτη ενδομεμβρανική περιοχή, όπου τα υπεύθυνα για τη σύνδεση αμινοξέα δημιουργούν μια θήκη σύνδεσης (binding pocket) [27](*Εικ.3*). Η τρίτη ενδοκυτταρική θηλιά, η οποία είναι και η μεγαλύτερη, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς συμμετέχει στη σύνδεση του υποδοχέα με την πρωτεΐνη G και καθορίζει το είδος της πρωτεΐνης G με την οποία θα συνδεθεί ο υποδοχέας. Το εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα εμφανίζει θέσεις γλυκοζυλίωσης ενώ το ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό του άκρο είναι μια μακριά αλυσίδα, η οποία συνδέεται στη μεμβράνη μέσω μιας παλμιτοϋλιωμένης κυστεΐνης. Οι ενδοκυτταρικοί βρόχοι και η καρβοξυτελική ουρά μεταφέρουν το σήμα στη G πρωτεΐνη και δρουν ως υποστρώματα για φωσφορυλιώσεις από πρωτεϊνικές κινάσες.





**Εικόνα 3.** Η τρισδιάστατη δομή του CB1 υποδοχέα προσδιορίστηκε πρόσφατα [28].

Εξαιτίας της υψηλής τους υδροφοβικότητας, τα κανναβινοειδή αρχικά θεωρήθηκε ότι ασκούν την δράση τους όπως και τα αναισθητικά, εισερχόμενα δηλαδή μη ειδικά στα κύτταρα μέσω των βιολογικών μεμβρανών. Πλέον είναι σαφές ότι κάθε ένα από τα προαναφερθέντα μόρια αλληλεπιδρά με τους CB1Rs και CB2Rs με ειδικό τρόπο.

Υπάρχουν δημοσιεύσεις για την ύπαρξη επιπλέον υποδοχέων κανναβινοειδών, πλην του CB1R και του CB2R. Αυτό προκύπτει από παρατηρήσεις ότι η δράση κάποιων ουσιών, όπως του μη-ψυχοδιεγερτικού αναλόγου κανναβινοειδών *abn*-CBD (*abnormal cannabidiol*), παρόλο που παράγει αποτελέσματα παρόμοια με αυτά των κανναβινοειδών στο περιφερικό σύστημα, δεν ενεργοποιεί ούτε το CB1R ούτε το CB2R [29-30]. Ευρήματα σε εγκεφάλους προερχόμενους από ποντίκια που δε φέρουν το γονίδιο του CB1R (CB1R knockout mice) έδειξαν σημαντική (αν και μειωμένη) πρόσδεση του αγωνιστή [<sup>3</sup>H]WIN 55212-2 [31]. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας GPR55 [32]. Ο GPR55 είναι ένας ορφανός GPCR που έχει χαμηλό ποσοστό ομολογίας (homology) με τους CB1Rs και CB2Rs, ενώ εκφράζεται στον όρχι σε επίπεδα 15 φορές μεγαλύτερα από αυτά του εγκεφάλου. Δε φαίνεται να είναι συζευγμένος με *G<sub>i/o</sub>* πρωτεΐνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια από αυτά των CB1Rs και CB2Rs.

Πέραν των συνθετικών κανναβινοειδών που δρουν ως αγωνιστές στους CB1Rs και CB2Rs, μία σειρά συνθετικών ουσιών που δρουν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων των κανναβινοειδών, είναι επίσης διαθέσιμη [33]. Από αυτούς, οι *rimonabant* (SR141716) και AM251, έχουν επιλεκτική δράση στο CB1 υποδοχέα (**Πίν. 1**).

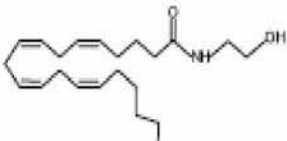
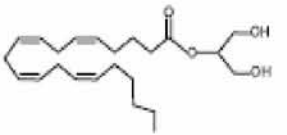
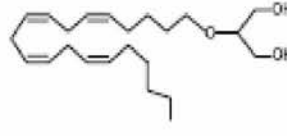
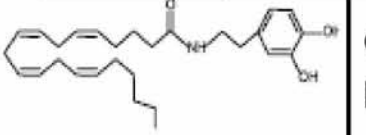
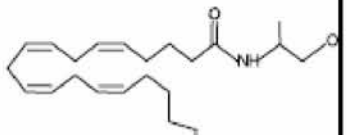
### 1.2.2. Ενδοκανναβινοειδή

Μετά την ανακάλυψη των υποδοχέων των κανναβινοειδών, ήταν σημαντικό να διαπιστωθεί, εάν ο οργανισμός των θηλαστικών παράγει, επίσης, αγωνιστές του υποδοχέα των κανναβινοειδών ή εάν οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν στόχο μόνο των φυτοκανναβινοειδών και των συνθετικών αναλόγων τους. Η αναζήτηση αυτή κατέληξε στην ανακάλυψη μίας σειράς παράγωγων του αραχιδονικού οξέως με ισχυρή πρόσδεση στους υποδοχείς των κανναβινοειδών που περιλαμβάνουν: την ανανδαμίδα (N-arachidonyl-ethanolamine, AEA) [34], την 2-αραχιδοנוύλγλυκερόλη (2-AG) [35], τον αιθέρα της νολαδίνης (2-AGE) [36] και τη N-αραχιδοנוύλντοπαμίνη (NADA) [37] (*Πίν.2*). Τα ενδογενή κανναβινοειδή, γνωστά ως «ενδοκανναβινοειδή», που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο ή σε άλλους ιστούς, συντίθενται και απελευθερώνονται τοπικά. Από αυτά, η ανανδαμίδα (AEA) είναι ο προσδέτης που έχει μελετηθεί περισσότερο εκτεταμένα μέχρι σήμερα. Το μόριο αυτό έχει διαφορετική χημική σύσταση από τα φυτοκανναβινοειδή και είναι το αμίδιο που προκύπτει από ένωση αραχιδονικού οξέος και αιθανολαμίνης με τη δράση της υδρολάσης των αμιδίων λιπαρών οξέων, δρώντας αντίστροφα ή από προουπάρχουσα N-αραχιδοנוύλο-φωσφατιδυλαιθανολαμίνη με τη δράση της φωσφωδιεστεράσης (φωσφολιπάση D) [38]. Το όνομα του το πήρε από τη σανσκριτική λέξη “ananda”, που σημαίνει «ευφορία», «ευδαιμονία». Η ανανδαμίδα έχει μελετηθεί διεξοδικά και πληροί τα τρία κριτήρια που την καθιστούν ένα από τα ενδογενή κανναβινοειδή μόρια: α. παραγωγή εξαρτώμενη από την δραστηριότητα, β. λειτουργική ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών και γ. βιολογική απενεργοποίηση.

Τα ενδοκανναβινοειδή μόρια παρουσιάζουν διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, η 2-AG διεγείρει με την ίδια αποτελεσματικότητα τόσο τις  $G_i$ , όσο και τις  $G_o$  πρωτεΐνες. Αντίθετα, η ανανδαμίδα είναι ολικός αγωνιστής των  $G_i$ , αλλά μερικός αγωνιστής των  $G_o$  πρωτεϊνών. Το εύρημα της διαφορικής ρύθμισης των  $G$  πρωτεϊνών από τα ενδοκανναβινοειδή αποτελεί έναν μηχανισμό ποικίλων επιδράσεων των ενδοκανναβινοειδών στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό.

Τη σύνθεση των κανναβινοειδών που αναφέρθηκαν προηγουμένως (*Πίν.1*) ακολούθησε η σύνθεση αναλόγων των ενδογενών κανναβινοειδών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεθανανδαμίδα, η οποία αποτελεί σταθερό ανάλογο της ενδογενούς ανανδαμίδης και είναι επιλεκτικός αγωνιστής του CB1 υποδοχέα (*Πίν.2*) [39].



Ενδογενή Κανναβινοειδή	Συντακτικός τύπος	Δραστικότητα
Ανανδαμίδα Anandamide (AEA)		CB1>>CB2 αγωνιστής [35]
2-αραχιδοנוύλγλυκερόλη (2-AG)		CB1≈CB2 αγωνιστής [35]
Νολαδινικός αιθέρας (2-AGE)		CB1>>CB2 αγωνιστής [36]
N-αραχοδοנוύλντοπαμίνη (NADA)		CB1>>CB2 αγωνιστής [37]
<b>Συνθετικά Ανάλογα Ενδοκανναβινοειδών</b>		<b>Ki (nM) for</b>
Μεθανανδαμίδα (mAEA) R(+)-MA		CB1      CB2 20      815 [39-40]

**Πίνακας 2.** Συντακτικός τύπος και φαρμακολογική δραστηριότητα επιλεγμένων ενδογενών κανναβινοειδών και σταθερών αναλόγων ενδοκανναβινοειδών.

### 1.2.3. Κατανομή των υποδοχέων των κανναβινοειδών στο νευρικό σύστημα

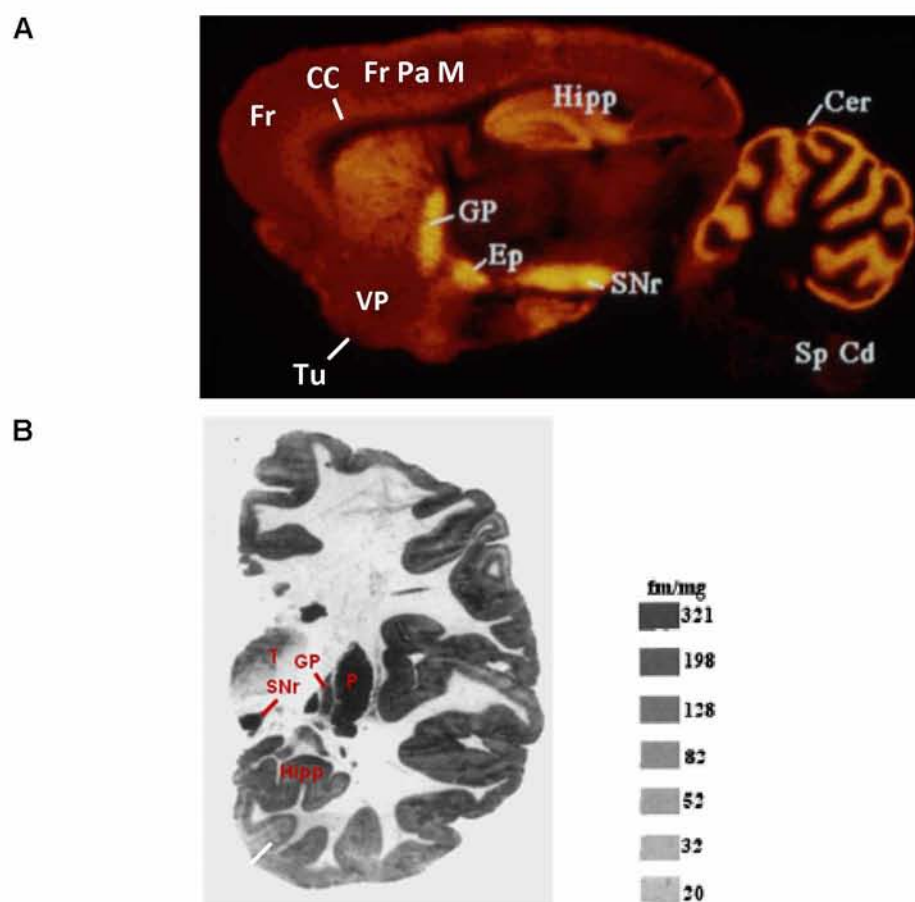
Η κατανομή των CB1 υποδοχέων χαρτογραφήθηκε για πρώτη φορά στον εγκέφαλο επίμυ με μελέτες ποσοτικής αυτοραδιογραφίας, οι οποίες χρησιμοποίησαν ως ραδιοπροσδέτη το  $[H^3]$ CP-55,940 που δεσμεύεται σε υψηλής συγγένειας θέσεις του CB1R (**Εικ.4Α**) [41]. Η εγκυρότητα της χρήσης αυτού του ραδιοπροσδέτη επιβεβαιώθηκε από αυτοραδιογραφικές μελέτες σε ποντίκια που δε φέρουν το γονίδιο του CB1R (CB1R knockout mice), στα οποία πράγματι δεν ανιχνεύθηκαν θέσεις δέσμευσης του  $[H^3]$ CP-55,940 [42]. Η αυτοραδιογραφική μεθοδολογία επιβεβαιώθηκε από μελέτη ανοσοϊστοχημείας κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που συνδέονται με το αμινοτελικό (N-terminus) ή το καρβοξυτελικό (C-terminus) άκρο της πρωτεΐνης του CB1R προκειμένου να εντοπιστεί περαιτέρω η

κατανομή του CB1R στον εγκέφαλο [43-44]. Οι αυτοραδιογραφικές και ανοσοϊστοχημικές προσεγγίσεις αποκάλυψαν παρόμοια γενική εικόνα σχετικά με την κατανομή του CB1 υποδοχέα στον εγκέφαλο.

Ο CB1 υποδοχέας βρέθηκε να εκφράζεται σε αφθονία σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον ιππόκαμπο, τα βασικά γάγγλια (ραβδωτό σώμα, μέλανα ουσία, ωχρά σφαίρα), τον εγκεφαλικό φλοιό, την αμυγδαλή, τον επικλινή πυρήνα και την παρεγκεφαλίδα (**Εικ.4**) [41,45]. Οι περιοχές αυτές σχετίζονται απόλυτα με τις παρατηρούμενες επιδράσεις της χρήσης κάνναβης στη συμπεριφορά, όπως γνωστική εξασθένηση, εξασθένηση της μάθησης και της μνήμης, και συντονισμού της κίνησης (**Πίν.3**) [46]. Η σχετική απουσία κανναβινοειδών υποδοχέων από τους πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους και τον προμήκη μυελό, ίσως εξηγεί τη χαμηλή τοξικότητα των κανναβινοειδών σε υψηλές δόσεις και το γεγονός ότι δεν επηρεάζουν αρνητικά την αναπνοή και τον καρδιακό ρυθμό. Οι CB1Rs εντοπίζονται κυρίως σε νευρωνικά κύτταρα, και λιγότερο σε αστρογλοϊκά, ολιγοδενδρογλοϊκά και προγονικά νευρικά κύτταρα. Τα υψηλότερα επίπεδα CB1 υποδοχέων εκφράζουν οι GABA-εργικοί, CCK-ανοσοθετικοί διάμεσοι νευρώνες του ιππόκαμπου, της αμυγδαλής, και του εγκεφαλικού φλοιού [47].

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), CB1 υποδοχείς έχουν εντοπιστεί στο σπλήνα, στις αμυγδαλές, στην ουροδόχο κύστη, στους σπερματικούς πόρους του ποντικού, σε απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, σε κύτταρα του λείου μυϊκού ιστού του χάμστερ και της γάτας, και σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα επινεφρίδια, στην καρδιά, στον προστάτη, στη μήτρα και στις ωοθήκες [48].

Παρόμοια κατανομή των CB1Rs έχει βρεθεί και στον ανθρώπινο εγκέφαλο (**Εικ. 4B**) [49-50]. Ωστόσο, η μεγαλύτερη πυκνότητα των CB1Rs στις συνειρμικές περιοχές του φλοιού του μετωπιαίου και μεταιχμιακού λοβού του ανθρώπινου εγκεφάλου σε σχέση με τις πρωτεύουσες αισθητηριακές και κινητικές περιοχές [49], υποδηλώνει ένα σημαντικότερο ρόλο των CB1Rs στην επεξεργασία των πληροφοριών που αφορούν στο κίνητρο (μεταιχμιακός φλοιός) και τη γνώση (συνειρμική περιοχή) του ανθρώπου.



**Εικόνα 4.** Κατανομή του CB1R στον εγκέφαλο. Αυτοραδιογραφία με το ραδιοσημασμένο υψηλής συγγένειας αγωνιστή-προσδέτη CP-55940 (A) σε οβελιαία τομή εγκεφάλου επίμου [41] και (B) σε στεφανιαία τομή ανθρώπινου εγκεφάλου μετά θάνατον [50]. Cer= παρεγκεφαλίδα, Sp Cd=νωτιαίος μυελός, Hipp=ιππόκαμπος, SNr=μέλανα ουσία, GP=ωχρά σφαίρα, EP=ενδοσκοινοειδής πυρήνας, CC=μεσολόβιο, Fr=μετωπιαίος φλοιός, FrPaM=μετωποβρεγματική κινητική περιοχή, Tu=οσφρητικό φύμα, VP=οπισθοκοιλιακός θάλαμος, T=θάλαμος, P=κέλυφος φακοειδούς πυρήνα

Εγκεφαλική περιοχή	Λειτουργία
Παρεγκεφαλίδα	Συντονισμός σωματικών κινήσεων
Ιππόκαμπος	Μνήμη και Μάθηση
Εγκεφαλικός Φλοιός	Ανώτερες γνωστικές λειτουργίες
Επικλινής Πυρήνα	Ανταμοιβή
<b>Βασικά Γάγγλια</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ραβδωτό σώμα</li> <li>• Μέλανα ουσία</li> <li>• Ωχρά σφαίρα</li> <li>• Κέλυφος κερκοφόρου πυρήνα</li> </ul>	Έλεγχος κίνησης
Αμυγδαλή	Συναισθηματικές αντιδράσεις, φόβος

**Πίνακας 3.** Κατανομή του CB1R και λειτουργικότητα. Ο CB1R εκφράζεται σε αφθονία σε περιοχές του εγκεφάλου που ρυθμίζουν την κίνηση, το συντονισμό, τη μάθηση και τη μνήμη, και ανώτερες γνωστικές λειτουργίες όπως κρίση.



Ένα βασικό χαρακτηριστικό των CB1Rs είναι ότι εντοπίζονται κυρίως προσυναπτικά, στους νευράξονες και στις νευρικές απολήξεις, και απουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό από τα κυτταρικά σώματα ή τους δένδριτες [51]. Η κατανομή του CB1 υποδοχέα στον εγκέφαλο δεν ακολουθεί τα επίπεδα της ανανδαμίδης και των υπολοίπων ενδοκανναβινοειδών σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές [52-53]. Υπάρχει σημαντικότερος, όμως, συσχετισμός ανάμεσα στην τοπική κατανομή των CB1Rs και του ενζύμου FAAH που μετέχει στην αποδόμηση/απενεργοποίηση των ενδογενών κανναβινοειδών. Ανοσοϊστοχημική μελέτη αποκάλυψε μια συμπληρωματική σχέση ανάμεσα στο FAAH και στο CB1R σε συναπτικό επίπεδο [43]. Η στενή και συμπληρωματική αυτή σχέση ανάμεσα στο FAAH και στο CB1R οδήγησε στην υπόθεση ότι το FAAH πιθανά να συμμετέχει στην απενεργοποίηση των ενδογενών κανναβινοειδών που απελευθερώνονται τοπικά στις συνάψεις [54]. Η τελευταία αυτή παρατήρηση, σε συνδυασμό με τον προσυναπτικό εντοπισμό των CB1Rs και το γεγονός ότι τα ενδογενή κανναβινοειδή συντίθενται από μετασυναπτικά κύτταρα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι CB1Rs ρυθμίζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και λειτουργούν ως ανάδρομοι αγγελιαφόροι (retrograde messengers) [47,54].

Οι CB2 υποδοχείς περιορίζονται στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) και mRNA των CB2Rs έχει βρεθεί στο σπλήνα, στις αμυγδαλές και στο θύμο αδέν, όπου βρίσκονται οι κύριοι ιστοί της κυτταρικής παραγωγής και ρύθμισης του ανοσοποιητικού [17,55]. CB2 υποδοχείς έχουν εντοπιστεί σε Β και Τ λεμφοκύτταρα, φυσικά κυτταροκτόνα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, σιτευτικά κύτταρα, καθώς επίσης και σε κυτταρικά μοντέλα καλλιέργειας προερχόμενα από τα παραπάνω κύτταρα του ανοσοποιητικού. Εξαίρεση στον κανόνα ότι οι CB2Rs βρίσκονται αποκλειστικά στην περιφέρεια, αποτελεί η έκφρασή τους σε μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου κάτω από συνθήκες φλεγμονής [56]. Η τελευταία αυτή παρατήρηση εναρμονίζεται με τον ευρέως γνωστό ανοσοτροποποιητικό ρόλο των CB2Rs. Αγωνιστές του CB2R δρουν σε γενικές γραμμές κατασταλτικά στη λειτουργία των κυττάρων αυτών, αλλά φαίνεται να είναι αποτέλεσμα συμμετοχής τόσο των CB1 όσο και των CB2 υποδοχέων [55].

### **1.3. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΝΣ**

Τα κανναβινοειδή επηρεάζουν διάφορα συστήματα του οργανισμού (νευρικό, νευρομυϊκό, ανοσοποιητικό, καρδιαγγειακό, αναπαραγωγικό, αναπνευστικό κ.α.) και προκαλούν είτε οξεία είτε χρόνια προβλήματα [57]. Δρουν κυρίως στο νευρικό λόγω της αποκλειστικής έκφρασης σε αυτό των CB1 υποδοχέων [41, 49]. Η εξασθένηση της μνήμης και της μάθησης, καθώς και οι διαταραχές της ψυχοκινητικής δραστηριότητας, αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες συμπεριφορικές επιδράσεις της σηματοδότησης του CB1 υποδοχέα. Η ανάμιξη των κανναβινοειδών στις παραπάνω γνωσιακές και κινητικές συμπεριφορές στάθηκε αφορμή για τη διατύπωση υποθέσεων σχετικά με την ικανότητα των ουσιών αυτών να επάγουν αλλαγές στην πλαστικότητα του ΚΝΣ [58]. Στα υποκεφάλαια που ακολουθούν θα αναφερθούν οι βασικότερες επιδράσεις των κανναβινοειδών στο ΚΝΣ τόσο σε νευρωνικό/κυτταρικό επίπεδο όσο και στο οργανισμικό. Η περαιτέρω μελέτη των συμπεριφορικών δράσεων της κάνναβης, πιθανά να οδηγήσει και σε αντίστοιχες θεραπευτικές εφαρμογές των κανναβινοειδών ή/και των ανταγωνιστών τους [59].

#### **1.3.1. Επίδραση των κανναβινοειδών στην ανάπτυξη του ΚΝΣ και τη συναπτική δραστηριότητα**

Συσσωρευμένα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το ενδοκανναβινοειδές σύστημα επιδρά στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), και συγκεκριμένα έχει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση νευρωνικών και γλοιακών κυττάρων, τη διαφοροποίηση, τη δημιουργία νευριτικών αποφύσεων και τη συναπτογένεση. Συνοπτικά, η παρουσία των CB1 υποδοχέων στην υποκοιλιακή ζώνη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου υποδεικνύει πιθανή συμμετοχή του συστήματος των κανναβινοειδών στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων κυττάρων και στην επαγωγή της διαφοροποίησής τους σε γλοιακά κύτταρα [60], σε μία προσπάθεια να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των γλοιακών και νευρωνικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Ενεργοποίηση του CB1R επάγει την ακτινωτή μετανάστευση μη ώριμων πυραμιδικών κυττάρων [61] και, σε συνεργασία με το νευροτροφικό παράγοντα BDNF (brain-derived neurotrophic factor) και τη διενεργοποίηση του μονοπατιού του TrkB (tyrosine kinase receptor B), διευκολύνει τη μετανάστευση των διάμεσων νευρώνων [62]. Καθώς, όμως, και οι ώριμοι νευρώνες διαθέτουν λειτουργικούς CB1Rs, το ενδοκανναβινοειδές σύστημα φαίνεται να συμμετέχει και στη δημιουργία περισσότερο διαφοροποιημένων



νευρωνικών κυττάρων. Το σύστημα των κανναβινοειδών παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες όψεις της διαφοροποίησης του αυξητικού κώνου και στην καθοδήγηση του νευράξονα μέσω ρύθμισης της σύνθεσης και λειτουργίας μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, όπως φαίνεται από τον εντοπισμό των CB1 υποδοχέων στους αυξητικούς κώνους αξόνων που επιμηκύνονται [63]. Αντίθετα, σημαντικά ελλείμματα στη δεσμίωση (fasciculation) του άξονα βρέθηκαν σε ποντίκια που δεν εκφράζουν CB1 υποδοχείς ή μετά από φαρμακολογική αναστολή των CB1R υποδοχέων [61,64]. Η ικανότητα δημιουργίας αποφυάδων (δενδριτών) εμφανίζει τη μέγιστη πολυπλοκότητά της στους νευρώνες, οι οποίοι χρησιμοποιούν τους δενδρίτες για τη ρύθμιση του αριθμού των συναπτικών επαφών τους. Οι Tagliaferro et al. [65] μετά από χορήγηση κανναβινοειδών για 14 ημέρες, εντόπισαν σε τομές διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών επίμυ (π.χ ιπποκάμπου, παρεγκεφαλίδας, ραβδωτού σώματος κ.α.) αυξημένη εμφάνιση δενδριτών που υποδεικνύει αύξηση στο πάχος των δενδριτών (dendritic thickness) ή/και μεγαλύτερο αριθμό διακλαδώσεων (branching). Καθώς τα κανναβινοειδή μπορούν να επάγουν αλλαγές στις συναπτικές συνδέσεις, αυτού του είδους οι αλλαγές στη δομή των δενδριτών πιθανά να αποτελούν φαινόμενα διακλαδώσεων που οδηγούν στη δημιουργία νέων συνδέσεων και επάγουν ένα είδος πλαστικότητας στο ΚΝΣ [65], εννοώντας την ικανότητα του εγκεφάλου να τροποποιείται τόσο μορφολογικά, όσο και λειτουργικά, ως απάντηση σε αλλαγές του περιβάλλοντος.

Εκτός από το ρόλο του συστήματος των κανναβινοειδών στη νευρική ανάπτυξη, φυσιολογικές, φαρμακολογικές και υψηλής ευκρίνειας ανατομικές μελέτες που διερεύνησαν τις κυτταρικές και «δικτυακές» (network) επιδράσεις των κανναβινοειδών, κατέδειξαν ότι η σημαντικότερη φυσιολογική τους δράση είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών. Αυτή επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των προσυναπτικών CB1 υποδοχέων που, όπως είδαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, εντοπίζονται σε διαφορετικούς τύπους νευρικών απολήξεων ανά τον εγκέφαλο [66-67]. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα ελέγχει τη σηματοδότηση και την «επικοινωνία» μεταξύ των νευρώνων ανάδρομα [47,54]. Κλασσικά, σε μια χημική σύναψη ένας νευροδιαβιβαστής απελευθερώνεται προσυναπτικά και διαχέεται στο μετασυναπτικό τμήμα, όπου προσδένεται και ενεργοποιεί τους υποδοχείς. Στην ανάδρομη, όμως, σηματοδότηση, ένας αγγελιαφόρος απελευθερώνεται στο μετασυναπτικό τμήμα και ταξιδεύει «προς τα πίσω», όπου ενεργοποιεί τους υποδοχείς του προσυναπτικού κυττάρου προκαλώντας μείωση στην απελευθέρωση ανασταλτικών ή διεγερτικών διαβιβαστών (depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) or excitation (DSE)) και, συνεπώς, αλλαγές

στη συναπτική διαβίβαση [66]. Αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών από τους νευρώνες του ΚΝΣ μετά από THC και άλλα εξωγενώς χορηγούμενα κανναβινοειδή έχει παρατηρηθεί από πολλές μελέτες [68] και φαίνεται να επηρεάζει τη συναπτική λειτουργία. Αναφορικά με το ΚΝΣ, ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων αναστέλλει ενδεικτικά, ανάμεσα σε άλλες περιοχές, την απελευθέρωση γλουταμινικού από τον ιππόκαμπο μυός [69], ντοπαμίνης από τομές του ραβδωτού τμήματος επίμου [70], νοραδρεναλίνης από ιππόκαμπο ανθρώπου και ινδικού χοιριδίου [71], και ακετυλοχολίνης [72] και GABA από ιππόκαμπο επίμου [73].

Η τροποποίηση των συναπτικών συνδέσεων μεταξύ των νευρώνων σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αποθήκευση της μνήμης και συγκεκριμένα με δύο μορφές συναπτικής πλαστικότητας, τη μακροχρόνια ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP) των συναπτικών συνδέσεων του ιπποκάμπου και τη λειτουργικά αντίστροφη της, μακροχρόνια αποδυνάμωση (Long-Term Depression, LTD). Ενδογενή κανναβινοειδή έχουν βρεθεί να αναστέλλουν το LTP [74-75]. Καθώς για τις LTP και LTD δραστηριότητες του ιπποκάμπου είναι απαραίτητη η εκπόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης για την αποκατάσταση του μπλοκαρισμένου μαγνησίου από τους NMDA υποδοχείς και την ακόλουθη είσοδο του ασβεστίου [76], μείωση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών προκαλεί εξασθένηση των LTP και LTD, αδυνατώντας να προκληθεί εκπόλωση του μετασυναπτικού κυττάρου σε βαθμό τέτοιο ώστε να επιτευχθεί η αποκατάσταση του μαγνησίου. Επομένως, η ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων δεν αναστέλλει απευθείας τους μοριακούς μηχανισμούς της συναπτικής πλαστικότητας, αλλά μέσω της μείωσης της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών προλαμβάνει την απαραίτητη για τις LTP και LTD εκπόλωση του μετασυναπτικού κυττάρου [77].

Εξαιρετικής σημασίας ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η ικανότητα των συνθετικών κανναβινοειδών και των φυτοκανναβινοειδών να παρακάμπτουν τον αποπτωτικό (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) μηχανισμό και να παρέχουν νευροπροστασία ενάντια σε ένα μεγάλο αριθμό προσβολών, όπως ισχαιμία [78], διεγερόμενη τοξικότητα (excitotoxicity) [79], σκλήρυνση κατά πλάκας [80-81], επιληπτικές κρίσεις [82], ασθένειες Huntington και Parkinson [83-84]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για τις εκτεταμένες αυτές θετικές επιδράσεις των κανναβινοειδών σε διαφορετικά μοντέλα νευρωνικής βλάβης περιλαμβάνουν: τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, την αναστολή της απελευθέρωσης γλουταμινικού διαβιβαστή ο οποίος έχει συνδεθεί άμεσα με το θάνατο των νευρώνων μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο, υποξία, υπογλυκαιμία και



επιληψία, τη μείωση εισροής ασβεστίου και την επαγωγή της φωσφορυλίωσης των ρυθμιζόμενων από εξωκυτάρια σήματα κινασών (ERK) (βλέπε κεφάλαιο 1.4.3), την ενεργοποίηση του NF-kB παράγοντα μεταγραφής και την απελευθέρωση νευροτροφινών [ανασκόπηση 85] .

### 1.3.2. Επίδραση των κανναβινοειδών σε λειτουργίες του ΚΝΣ

#### *Μνήμη και μάθηση*

Η χρήση της κάνναβης έχειδειχθεί να προκαλεί διαταραχές της λειτουργίας της άμεσης μνήμης, της ικανότητας συγκέντρωσης και προσοχής, της ικανότητας εκτέλεσης σύνθετων νοητικών διεργασιών και της αντίληψης της διάρκειας του χρόνου. Μια από τις καλύτερα τεκμηριωμένες δράσεις της κάνναβης στη γνωστική λειτουργία, τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο, είναι η εξασθένηση της βραχυπρόθεσμης και της λειτουργικής μνήμης. Η βραχυπρόθεσμη μνήμη είναι περιορισμένης χωρητικότητας και έχει ως σκοπό τη συγκράτηση των πληροφοριών μέχρι να υποστούν την περαιτέρω επεξεργασία αποθήκευσης ή διαγραφής. Ο όρος "λειτουργική" μνήμη αφορά τις διεργασίες επεξεργασίας μιας μνημονικής πληροφορίας προκειμένου αυτή να εγχαραχθεί [86]. Αντίθετα, η ανάκληση παλαιότερων πληροφοριών δε φαίνεται να επηρεάζεται υπό την επήρεια κάνναβης [87-89].

Μελέτες της ανθρώπινης συμπεριφοράς δείχνουν ότι η μαριχουάνα προκαλεί έκπτωση στην εκτέλεση δοκιμασιών που αφορούν τη βραχυπρόθεσμη επεισοδιακή και λειτουργική μνήμη [87,90]. Συγκεκριμένα, οξεία χρήση Δ<sup>9</sup>-THC επηρεάζει παροδικά την ικανότητα ελεύθερης ανάκλησης λέξεων λίστας που παρουσιάζονται μετά τη χορήγησή της. Η ελεύθερη ανάκληση εμφανίζεται εξασθενημένη τόσο αμέσως μετά την παρουσίαση της λίστας (άμεση ανάκληση) όσο και μετά το πέρασμα 20 min της παρουσίας αυτής (καθυστερημένη ανάκληση). Στην περίπτωση της άμεσης ανάκλησης, λέξεις που παρουσιάζονται στο τέλος της λίστας είναι πιθανότερο να ανακληθούν σε σχέση με τις πρώτες, ένδειξη ότι κάποιες όψεις της αποθήκευσης της μνήμης έχουν διαταραχθεί. Συχνή είναι, επίσης, η προκαλούμενη από κανναβινοειδή παρείσφρηση μνήμης (ανάκληση λέξεων που δε συμπεριλαμβάνονταν στη λίστα). Από την άλλη, η αναγνώριση λέξεων που η παρουσίασή τους είχε προηγηθεί της χορήγησης κάνναβης δε φαίνεται να επηρεάζεται [90]. Οι επιδράσεις αυτές στη μνήμη είναι δοσοεξαρτώμενες και ισχυρότερες στις περιπτώσεις που η κάνναβη εισπνέεται ή λαμβάνεται ενδοφλέβια. Παρόμοια ελλείμματα στην ικανότητα

ανάκλησης πρόσφατα παρουσιασμένων λέξεων εμφανίζουν και χρόνιοι χρήστες κάνναβης παρόλο που κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας δε βρίσκονται υπό την επήρεια ουσιών (unintoxicated state) [91]. Μεγαλύτερες αλλαγές στη λειτουργία της μνήμης έναντι της ομάδας ελέγχου φαίνεται να έχουν οι χρήστες κάνναβης με μακροχρόνιο ιστορικό και ξεκίνημα της χρήσης σε νεαρή ηλικία [91]. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω επιδράσεις της κάνναβης στη μνήμη, μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι η χρήση κανναβινοειδών επηρεάζει όλα τα στάδια της μνήμης, συμπεριλαμβανομένων της κωδικοποίησης, της αποθήκευσης και της ανάκλησης της πληροφορίας [90].

Μελέτες υποστηρίζουν απόλυτα τη σύνδεση ανάμεσα σε προκαλούμενα από κανναβινοειδή μνημονικά ελλείμματα και έκπτωση της λειτουργίας του ιππόκαμπου [92]. Σε πρωτεύοντα, χορήγηση  $\Delta^9$ -THC (4 mg/kg) προκαλεί εξασθένηση της ικανότητας οπτικής αναγνώρισης, όπως αποκαλύφθηκε από δοκιμασία μη ταύτισης προς όμοιο (nonmatching-to-sample) που έχει ως σκοπό το πειραματόζωο να αναγνωρίσει από ένα ζεύγος αντικειμένων, το αντικείμενο που του παρουσιάστηκε 15 λεπτά νωρίτερα [93]. Αντίθετα, τα κανναβινοειδή δε φαίνεται να έχουν επίδραση ακόμη και σε υψηλές δόσεις (16 mg/kg) στη διακριτική μάθηση (discrimination learning), δοκιμασία στην οποία τα πειραματόζωα καλούνται μετά από 24-ωρη εκπαίδευση να αναγνωρίσουν το αντικείμενο που συνοδεύεται πάντα από φαγητό. Η διαφορετική αυτή επίδραση της  $\Delta^9$ -THC στις δύο προαναφερθείσες ικανότητες μάθησης και η συμμετοχή του μεταχαιμιακού συστήματος στην ικανότητα οπτικής αναγνώρισης, αλλά όχι στη διακριτική μάθηση, πιθανά αντανακλά επιλεκτική δράση της THC στο μεταχαιμιακό σύστημα [93].

Τα κανναβινοειδή προκαλούν έκπτωση στην εκτέλεση ποικίλων δοκιμασιών μνήμης και σε πειραματόζωα [88]. Χορήγηση  $\Delta^9$ -THC (8 mg/kg ενδοπεριτοναϊκά) σε ποντίκια 30 λεπτά προτού υποβληθούν στη δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου του Morris (Morris-type water maze) που αξιολογεί τη χωρική μνήμη, προκάλεσε επιλεκτική έκπτωση στις ικανότητες κωδικοποίησης και στην εκτέλεση της δοκιμασίας που αφορά τη λειτουργική μνήμη των ποντικών [89,94]. Αντίθετα, η εδραίωση και η ανάκτηση της πληροφορίας δεν επηρεάστηκε στην περίπτωση που η άσκηση για τη μάθηση αυτής της συμπεριφορικής διαδικασίας που αξιολογεί τη χωρική μνήμη των πειραματόζωων είχε προηγηθεί της χορήγησης του φαρμάκου [94]. Παρόμοια εξασθένηση της χωρικής μνήμης μετά από  $\Delta^9$ -THC ή άλλα κανναβινοειδή έχει παρατηρηθεί σε πειράματα με επίμυες που έδειξαν ότι ενδοϊπποκάμπια χορήγηση  $\Delta^9$ -THC προκαλεί εξασθένηση της μνημονικής λειτουργίας δρώντας στους CB1



υποδοχείς του ιππόκαμπου [95]. Εκτός από την εξασθένιση της χωρικής μνήμης, τα κανναβινοειδή, μεταξύ των οποίων και το ανάλογο της ενδογενούς ανανδαμίδης μεθανανδαμίδη, έχουν δειχθεί να προκαλούν εξασθένιση και της αναγνωριστικής μνήμης σε επίμυες όπως αποκάλυψε δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων (object recognition task) [96], υποστηρίζοντας περαιτέρω τη συμμετοχή των κανναβινοειδών και των υποδοχέων τους στη λειτουργική μνήμη.

Οι διαταραχές της μνήμης (κυρίως της λειτουργικής) που προκαλούν οι αγωνιστές των CB1 υποδοχέων, παρατηρούνται σε δόσεις πολύ μικρότερες (από 3 mg/kg σε ποντίκια) από αυτές που προκαλούν άλλες δράσεις, όπως κινητικές διαταραχές, αναλγησία, υποθερμία (100 mg/kg σε ποντίκια) [89]. Αυτό υποδεικνύει ότι η δράση των ουσιών αυτών θα πρέπει να είναι εκλεκτική και να αφορά στη μνήμη [59]. Η δράση των κανναβινοειδών στη μνήμη ενδέχεται να σχετίζεται με την αναστολή της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών που προκαλούν τα κανναβινοειδή στον ιππόκαμπο [88], όπως αναστολή απελευθέρωσης γλουταμινικού που ρυθμίζει την επαγωγή της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (long-term potentiation LTP) [69], καθώς και με μηχανισμούς σηματοδότησης που ρυθμίζονται από το CB1 υποδοχέα και έχει δειχθεί να επιδρούν στη μνήμη (π.χ ERKs 1/2) (βλέπε κεφάλαιο 1.4). Τα αποτελέσματα χρήσης των κανναβινοειδών στη μνήμη καθιστά πιθανή την εξέλιξη φαρμάκων που επηρεάζουν τα ενδογενή κανναβινοειδή ή τους υποδοχείς τους, ως φαρμάκων που ευοδώνουν τη μνήμη και τις γνωσιακές λειτουργίες.

### *Επιδράσεις στην κίνηση*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (**Πίνακας 3**), η αφθονία των CB1 υποδοχέων στην παρεγκεφαλίδα και τα βασικά γάγγλια δικαιολογεί την απώλεια στον έλεγχο της κίνησης που παρατηρείται μετά τη χρήση κάνναβης. Η μαριχουάνα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα επηρεάζει την κινητική δραστηριότητα, όπως αποδεικνύεται από την καθολική διαταραχή στην εκτέλεση ποικίλων έργων μέχρι τη μείωση του μυϊκού τόνου και του κινητικού συντονισμού [97] που προκαλούν στατική αταξία, καταληψία και μειωμένη κινητικότητα [98]. Ως αποτέλεσμα των διαταραχών αυτών της κίνησης, η κάνναβη προκαλεί ελάττωση της ικανότητας χειρισμού και οδήγησης μηχανοκίνητων οχημάτων σε δρόμο [99] και εναέριων μέσων κυκλοφορίας [100]. Παρόλα αυτά, η προκαλούμενη από κάνναβη επικινδυνότητα οδήγησης υπολογίζεται να είναι μικρότερη από αντίστοιχα επίπεδα επήρειας οινόπνευματος, καθώς οι χρήστες κάνναβης αποδεικνύονται περισσότερο προσεκτικοί και λιγότερο επιθετικοί από αυτούς που έχουν καταναλώσει αλκοόλ [99]. Η συχνά

παρατηρούμενη, όμως, συγχορήγηση κάνναβης και οينوπνεύματος επιδεινώνει ακόμη περισσότερο τις ικανότητες αντίληψης, συντονισμού κι εγρήγορης, αυξάνοντας τον κίνδυνο πρόκλησης ατυχήματος. Η χορήγηση κανναβινοειδών σε πειραματόζωα προκαλεί τριφασική δράση στην κινητική συμπεριφορά που εξηγείται από τη σημαντική ρυθμιστική δράση που ασκούν τα κανναβινοειδή στα βασικά γάγγλια. Συγκεκριμένα, χαμηλές δόσεις THC (0.2 mg/kg) μειώνουν την κινητική δραστηριότητα, ενώ υψηλότερες δόσεις (1-2 mg/kg) προκαλούν διέγερση της κίνησης μέχρι να επέλθει καταληψία (2.5 mg/kg) συνοδευόμενη από μείωση της κινητικότητας [101].

Λόγω των δράσεων που ασκούν τα κανναβινοειδή στα βασικά γάγγλια [102], καθώς και της παρατήρησης ότι ο αριθμός των CB1 υποδοχέων είναι μειωμένος σε ασθενείς που πάσχουν από νευρολογικές νόσους που επηρεάζουν την κινητική λειτουργία και σε πειραματόζωα στα οποία έχουν προκληθεί κινητικές διαταραχές [84], έχει προταθεί ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σε διάφορες νόσους, όπως στη χορεία Huntington [83,103], στη νόσο Parkinson [84], σε δυστονίες [104] και στο σύνδρομο Tourette [105] [106]. Οι Hampson et al. [107] έδειξαν ότι τα κανναβινοειδή μπορεί να έχουν νευροπροστατευτική δράση λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Έτσι, μπορεί να αποτρέψουν τον κυτταρικό θάνατο σε διάφορες κινητικές διαταραχές, ιδιαίτερα στη χορεία Huntington, όπου γνωρίζουμε ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι ένα από τα κύρια κυτταροτοξικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την παθογένεση της διαταραχής [108].

Υπάρχουν συνεχώς αυξανόμενες ενδείξεις ότι η κάνναβη και άλλα κανναβινοειδή μπορεί να ανακουφίσουν το μυϊκό πόνο, τον τρόπο των άκρων και τη σπαστικότητα που βιώνουν ασθενείς που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας ή από βλάβες του νωτιαίου μυελού [109-110]. Οι Zajicek et al. [111-112], έδειξαν θετική δράση τόσο της Δ<sup>9</sup>-THC (dronabinol) όσο και του φυτοκανναβινοειδούς Cannador, στη σπαστικότητα, τα επίπεδα πόνου, την ποιότητα του ύπνου και στους σπασμούς που βιώνουν ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας.

### *Αναλγησία*

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας 20ετίας, πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν στραφεί στον προσδιορισμό της δράσης των κανναβινοειδών στη βλαβοδεκτική νευροδιαβίβαση. Από το 1899 ο Ernest Dixon είχε παρατηρήσει την αναλγητική δράση των κανναβινοειδών, αλλά μόλις τη δεκαετία του 1960 επιβεβαιώθηκε η



ικανότητα των κανναβινοειδών να καταστέλλουν τις συμπεριφορικές αντιδράσεις σε οξεία επώδυνα ερεθίσματα και σε νευρωνικά τραύματα. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τόσο τα ενδοκανναβινοειδή όσο και οι υποδοχείς τους ανευρίσκονται σε πολλές περιοχές του ενδογενούς συστήματος που είναι υπεύθυνο για τον πόνο, από τις ελεύθερες νευρικές απολήξεις μέχρι το νωτιαίο μυελό και τα υπερνωτιαία κέντρα. Κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους έδειξαν ότι η από του στόματος (20-50 mg) ή η ενδοφλέβια (0.022-0.044 mg/kg) χορήγηση THC και εκχυλισμάτων κάνναβης επιτυγχάνουν μείωση του πόνου στο μετεγχειρητικό οδοντικό [113], καρκινικό [114] και εντερικό πόνο [115]. Συνθετικά ανάλογα των κανναβινοειδών (0.25 mg/kg) έχουν βρεθεί να έχουν την ίδια ισχύ και αποτελεσματικότητα με τη μορφίνη (0.5 mg/kg) [116]. Η αναλγητική δράση των κανναβινοειδών φαίνεται να σχετίζεται με αλληλεπιδράσεις τους με το σύστημα των ενδογενών οπιοειδών [116]. Σημαντικότερα, υπάρχουν ενδείξεις πως ο συνδυασμός των δύο αυτών φαρμάκων, σε χαμηλότερες δόσεις από αυτές που θα χορηγούνταν καθένα από αυτά ξεχωριστά, έχει ιδιαίτερα αναλγητικά αποτελέσματα. Οι πιθανότητες εμφάνισης των τυπικών παρενεργειών της καθεμίας από αυτές τις ουσίες είναι σημαντικά μικρότερες όταν χορηγούνται συνδυαστικά [117]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι τα κανναβινοειδή είναι αποτελεσματικά ως αναλγητικά σε ζωικά μοντέλα χρόνιου πόνου, ο οποίος ως γνωστόν δεν αντιμετωπίζεται ικανοποιητικά ούτε με τα υπάρχοντα σήμερα οπιοειδή αναλγητικά [59]. Επιπλέον, οι περιφερικοί CB1 και CB2 υποδοχείς φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση του πόνου στο σημείο της βλάβης αναστέλλοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση [118]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι περαιτέρω έρευνα στην αναλγητική δράση των κανναβινοειδών πιθανά να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του χρόνιου ή οξέος πόνου, ποικίλης προέλευσης και αιτιολογίας.

### *Ρύθμιση της όρεξης*

Πολλές ατομικές εκθέσεις αναφέρουν ότι η τοξίκωση με κάνναβη συνδέεται με αύξηση της όρεξης ακόμη και σε άτομα που έχει επέλθει κορεσμός. Η ορεξιογόνος δράση των κανναβινοειδών έχει αποδειχθεί και σε εργαστηριακές συνθήκες (μετά από του στόματος χορήγηση μίας δόσης ~10-15 mg ή ~2.5 mg για τρεις ημέρες) [119], αν και τα αποτελέσματα από τις μελέτες σε ανθρώπους ποικίλουν, πιθανώς εξαιτίας του προσανατολισμού της αύξησης της όρεξης σε συγκεκριμένα είδη τροφής. Ελεγχόμενες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η THC (dronabinol, 5 mg ημερησίως για τουλάχιστον 7 μήνες) είχε ευεργετική επίδραση στην αντιμετώπιση της απώλειας της όρεξης και μείωσης του βάρους ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο HIV απίσχνανσης [120] που αποτελεί μία από τις ιατρικές περιπτώσεις για τις οποίες

επιτρέπεται η συνταγογράφηση της THC στις ΗΠΑ. Μία δεύτερη περίπτωση για την οποία έχει εγκριθεί η χρήση THC είναι η καταπολέμηση της καχεξίας που συνδέεται με απώλεια της όρεξης στους καρκινοπαθείς και συμβάλλει στην ταχύτερη ανάπτυξη της νόσου [121].

Η ενδογενής ανανδαμίδη επίσης διεγείρει την πρόσληψη τροφής σε επίμυες, δράση που αναστέλλεται από ανταγωνιστές των CB1 υποδοχέων [122]. Χορήγηση CB1R ανταγωνιστών καταστέλλουν την επιθυμία για φαγητό και προκαλούν μείωση του βάρους σε μη παχύσαρκους επίμυες [123]. Από τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι το σύστημα των κανναβινοειδών παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και του σωματικού βάρους.

#### *Ναυτία και έμετος*

Η ιδιότητα της THC καθώς και συνθετικών κανναβινοειδών, όπως η ναβιλόνη (Nabilone), να ρυθμίζουν τη ναυτία και τον έμετο που συνδέονται με τη χημειοθεραπεία σε καρκινοπαθείς είναι καλά τεκμηριωμένη και αποτελεί μία από τις πιο καλά μελετημένες ιατρικές εφαρμογές των φαρμάκων αυτών [124-126]. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα επιβεβαίωσαν ότι οι αντιεμετικές δράσεις των κανναβινοειδών λαμβάνουν χώρα μέσω των CB1 υποδοχέων [127], και οι ανταγωνιστές των CB1R δρουν ως εμετικά, δράση η οποία αναστέλλεται από THC [128]. Οι λεπτές ισορροπίες, όμως, ανάμεσα στην αντιεμετική δόση (συχνή δόση Nabilone 4 mg καθημερινά) και σε αυτές που προκαλούν τις γνωστές ανεπιθύμητες ψυχοτρόπες παρενέργειες των κανναβινοειδών (<3-4 mg) κατέστησαν τη χρήση τους προβληματική. Μάλιστα, με την ανάπτυξη τη δεκαετία του 1980 των νέων και ιδιαίτερα αποτελεσματικών αντιεμετικών που δρουν ως ανταγωνιστές του 5-HT<sub>3</sub> σεροτονινεργικού υποδοχέα και δε συνοδεύονται από παρενέργειες στη ψυχική σφαίρα, η χρήση των κανναβινοειδών ως αντιεμετικών περιορίστηκε [129].



#### 1.4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ CB1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Η μελέτη των μονοπατιών σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τα κανναβινοειδή προκαλώντας, είτε σε κυτταρικό είτε σε οργανισμικό επίπεδο, τις επιδράσεις στο ΚΝΣ που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, βρίσκεται στο επίκεντρο εκτεταμένων ερευνητικών προσπαθειών. Συγκεκριμένα, οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες ERK1 και ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) αποτελούν κρίσιμης σημασίας ενδιάμεσους μεσολαβητές της ενδοκυττάριας σηματοδότησης που αφορά σημαντικές λειτουργίες, όπως νευρωνική διαφοροποίηση, συναπτική πλαστικότητα και μνήμη [130]. Ωστόσο, και άλλες οδοί σηματοδότησης που ρυθμίζονται από το CB1 υποδοχέα (π.χ cAMP και δίαυλοι ιόντων) φαίνεται να συμμετέχουν στις παρατηρούμενες επιδράσεις των κανναβινοειδών στη μνήμη.

Προκειμένου να εστιάσουμε στη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης των ERK1/2 και στο ρόλο της σημαντικής για τη μνήμη πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) στο CB1R-ERK μονοπάτι που συνιστά και το βασικό στόχο της παρούσας διατριβής, θεωρούμε χρήσιμο να ανασκοπήσουμε τα σημαντικότερα στοιχεία της μεταγωγής σήματος μέσω των CB1 υποδοχέων.

##### 1.4.1 CBRs: Υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs)

Οι υποδοχείς των κανναβινοειδών (CBRs) ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (G-Protein Coupled Receptors, GPCRs) (**Εικ. 3**). Καθώς τα τελευταία χρόνια έχει γίνει δεκτό πως πολλοί GPCRs μπορούν επίσης να συζευχθούν με σηματοδοτικά μονοπάτια χωρίς τη βοήθεια G πρωτεϊνών [131], συχνά η οικογένεια αυτή απαντάται και ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς που διαπερνούν τη μεμβράνη επτά φορές ή επταελικοειδείς υποδοχείς. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν ήδη αναγνωριστεί εκατοντάδες GPCRs που συμμετέχουν στις απαντήσεις σε μια τεράστια ποικιλία εξωκυττάριων σηματοδοτικών μορίων. Τα τελευταία ποικίλουν τόσο ως προς τη δομή όσο και προς τη λειτουργία τους: μπορεί να είναι πρωτεΐνες, μικρά πεπτίδια, παράγωγα λιπαρών οξέων ή αραχιδονικού οξέος και για το κάθε ένα χωριστά υπάρχει ένας υποδοχέας ή ομάδα υποδοχέων. Στους GPCRs ανήκουν οι περισσότεροι υποδοχείς των νευροδιαβιβαστών: οι αδρενεργικοί ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), οι ντοπαμινεργικοί ( $D_1, D_2, D_3$ ), οι χολινεργικοί-μουςκαρινικοί ( $m_1-m_5$ ), οι σεροτονινεργικοί (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), κτλ. Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο μεταγωγής

σήματος μέσω GPCRs, ο υποδοχέας ενεργοποιεί μια ετεροτριμερή G πρωτεΐνη ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  υπομονάδες), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τελεστές (effectors) και αυτοί δεύτερους αγγελιαφόρους, ικανούς να προκαλέσουν διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Έχει ακόμα βρεθεί πως η δράση των GPCRs ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων υποδοχέων και συντελεί έτσι σε πιο πολύπλοκα και πολλές φορές μη προβλεπόμενα αποτελέσματα.

Οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες είναι σύμπλοκα  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - υπομονάδων. Κάθε GPCR δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) για αυτές τις G-πρωτεΐνες [132-133]. Η δέσμευση του αγωνιστή στον υποδοχέα οδηγεί σε αλλαγές στη στεροδιαμόρφωση του υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η G πρωτεΐνη να αναγνωρίζει και να προσδένεται σε ειδικό κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα, προκαλώντας την  $\alpha$ -υπομονάδα να αποβάλλει το συνδεδεμένο GDP και να το αντικαταστήσει με GTP. Στη συνέχεια, η G-πρωτεΐνη διίσταται σε μια ενεργοποιημένη  $\alpha$ -υπομονάδα με συνδεδεμένο GTP και ένα σύμπλοκο  $\beta\gamma$ . Έτσι, προκύπτουν δύο ανεξάρτητα τμήματα της πρωτεΐνης G και το καθένα από αυτά αλληλεπιδρά με διαφορετικά μόρια-στόχους του κυττάρου, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε διάφορες αποκρίσεις, μεταξύ των οποίων ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενζύμων και σχηματισμός δεύτερων αγγελιαφόρων (second messengers): π.χ  $\text{Ca}^{2+}$ , κυκλικού AMP (cAMP), τριφωσφορικής ινοσιτόλης ( $\text{IP}_3$ ) και διακυλογλυκερόλης (DAG) [134]. Οι δεύτεροι αγγελιαφόροι διαχέονται και ενεργοποιούν άμεσα ή έμμεσα πρωτεϊνικές κινάσες (PKA, PKC) ικανές να φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες-στόχους. Όσο περισσότερο χρόνο παραμένουν συνδεδεμένοι οι στόχοι με την  $\alpha$ - υπομονάδα ή το διμερές  $\beta\gamma$  τόσο πιο ισχυρό και παρατεταμένο θα είναι το μεταδιδόμενο σήμα. Η συμπεριφορά της  $\alpha$ -υπομονάδας καθορίζει το χρονικό διάστημα που τα δύο ενεργοποιημένα τμήματα της G πρωτεΐνης δρουν ανεξάρτητα. Η  $\alpha$ -υπομονάδα διαθέτει ενδογενή ενεργότητα υδρόλωσης του GTP και μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα υδρολύει το GTP σε GDP, το διμερές  $\beta\gamma$  επανασυνδέεται και σταματά η διαβίβαση σήματος.

Οι  $\alpha$ -υπομονάδες των G πρωτεϊνών κατατάσσονται σε 4 οικογένειες και κάθε GPCR μπορεί να ενεργοποιεί περισσότερες από μία υπομονάδες [135]. Οι πρωτεΐνες  $\text{G}_{\alpha_s}$  (G stimulatory) ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (AC), και συνεπώς αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP. Στην κατηγορία των πρωτεϊνών  $\text{G}_{\alpha_i}$  (G inhibitory) ορισμένα μέλη αναστέλλουν τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης, άλλα ρυθμίζουν τη λειτουργία καναλιών ιόντων, ενώ ορισμένα ( $\text{G}_{\alpha_o}$ ) ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC). Οι πρωτεΐνες αυτές, δηλαδή οι  $\text{G}_{\alpha_i}$ , έχουν το χαρακτηριστικό



γνώρισμα ότι είναι στόχοι μιας τοξίνης που παράγεται από το βακτήριο *Bordetella pertussis*, της τοξίνης του κοκκύτη (pertussis toxin, PTX), η οποία εμποδίζει τη σύνδεση της πρωτεΐνης  $G_i$  με τον υποδοχέα, εμποδίζοντας τη μετάδοση του μηνύματος. Άρα η PTX μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν τρόπος αναστολής της δράσης των  $G_i$  πρωτεϊνών. Η οικογένεια  $G_{q/11}$  συνδέεται με το ένζυμο PLC- $\beta$  και επάγει αύξηση του ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$  με συμμετοχή των δευτέρων αγγελιαφόρων  $IP_3$  και DAG, ο δεύτερος από τους οποίους ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Τέλος, η οικογένεια  $G_{12/13}$  αποτελείται από δύο μέλη, τη  $G_{12}$  και τη  $G_{13}$ , που επάγουν την ενεργοποίηση, για παράδειγμα, των Rho-GEFs και του αντιμεταφορέα  $Na^+/H^+$  [135]. Παρόλο που, όπως είναι φανερό, η α-υπομονάδα της πρωτεΐνης G έχει τον κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση του τελεστή, το σύμπλοκο των υπομονάδων  $\beta\gamma$  συνδέεται και αυτό με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης PLC- $\beta$  και D (PLD), της αδενυλικής κυκλάσης, της κινάσης 3 της φωσφατιδυλοϊνositόλης (PI3K) και των καναλιών ιόντων  $K^+$  και  $Ca^{2+}$  [135-136].

Δέσμευση των ενδογενών κανναβινοειδών ή των εξωγενώς χορηγούμενων αγωνιστών των κανναβινοειδών στους υποδοχείς τους, CBRs, οδηγεί σε αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να ευνοείται η πρόσδεση και η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που επικρατέστερα συζεύγνυνται με τους CBRs ανήκουν στην οικογένεια των ετεροτριμερών  $G_{i/o}$  πρωτεϊνών, αφού η τοξίνη του κοκκύτη (PTX) αναστέλλει τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από αυτούς [137-140]. Παρόλα αυτά, όμως, ένας αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι ο CB1 υποδοχέας ενδέχεται να εμφανίζει πλειοτροπισμό, δηλαδή να ασκεί πολλαπλές και διαφορετικές δράσεις ανάλογα με τον αγωνιστή και τον τύπο κυττάρου που δρα, ή να συνδέεται με περισσότερες από μια οικογένειες των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών. Σε συνθήκες που εμποδίζεται η σύνδεσή τους με  $G_{i/o}$  πρωτεΐνες, οι CB1 υποδοχείς μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με  $G_s$  πρωτεΐνες [18,141-143]. Σε καθεμία περίπτωση, η απόδοση της σύνδεσης με τις  $G_{i/o}/G_s$  μεταβάλλεται κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον αγωνιστή, παρατήρηση συχνά αναφερόμενη ως λειτουργική επιλεκτικότητα [144]. Συνεπώς, η διαφορική δράση καθενός αγωνιστή του CB1R στις G πρωτεΐνες θα μπορούσε κατά ένα μέρος να καθοριστεί από τον πλειοτροπισμό του υποδοχέα αναφορικά με τις G πρωτεΐνες που εξασφαλίζει διαφορετικές μεταβολές της κυτταρικής λειτουργίας [145].

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο CB1 υποδοχέας είναι πιθανό να διεγείρει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) [145-147]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη μελέτη του ενδεχόμενου ότι ίσως οι CB1Rs συνδέονται και με  $G_q$  πρωτεΐνες.

Πράγματι, ο αγωνιστής WIN55,212-2, αλλά όχι άλλοι αγωνιστές, βρέθηκε να προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε νευρώνες ιππόκαμπου και σε ανθρώπινα νεφρικά εμβρυικά κύτταρα (HEK283) μέσω πρόσδεσης σε  $G_{q/11}$  πρωτεΐνες [147]. Αντίθετα, η ευαίσθητη σε τοξίνη του κοκκίτη (PTX) μεταγωγή σήματος υποστηρίζεται από αναφορές με πολλούς αγωνιστές του CB1 υποδοχέα, υποδηλώνοντας την πιθανότητα  $G_{q/11}/G_{i/o}$  πλειοτροπισμού ειδικού για κάθε αγωνιστή [18,141,142,144]. Οι McIntosh et al. [145] έδειξαν παρόμοια σύνδεση του CB1R με  $G_{q/11}$  πρωτεΐνες για την ενεργοποίηση της PLC και την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, εξαρτώμενη επίσης από τον αγωνιστή WIN55,212 σε ανθρώπινα κύτταρα δοκιδώδους δομής (trabecular meshwork, hTM). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι ενδογενείς CB1Rs συζεύγνυνται τόσο με  $G_{q/11}$  όσο και με  $G_{i/o}$  σηματοδοτικά μονοπάτια και ρολοκλειδί στη σύνδεση αυτή παίζει η δομή του εκάστοτε αγωνιστή. Σηματοδότηση μέσω  $Ca^{2+}$  από ενεργοποίηση των CB1 και CB2 υποδοχέων μετά από διέγερση με τους αγωνιστές ACEA και JWH133 αντίστοιχα, έχει επίσης αναφερθεί και σε β-κύτταρα ινσουλινώματος, και αυτή η μεταγωγή σήματος βρέθηκε να είναι εξαρτώμενη από  $G_q/PLC$  [148]. Υπάρχουν, ωστόσο, και σηματοδοτικές οδοί του CB1 υποδοχέα που δε χρησιμοποιούν πρωτεΐνες G για τη μεταγωγή σήματος. Οι Sanchez et al. [149], για παράδειγμα, έδειξαν ότι για την ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης από το CB1R σε πρωτογενή φλοιϊκά αστροκύτταρα επίμυ ήταν απαραίτητη η μεσολάβηση της συνδετικής πρωτεΐνης Fan και όχι των G πρωτεϊνών.

Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των GPCRs οδηγεί σε ελάττωση των βιολογικών αποκρίσεων που προκαλούνται ύστερα από ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών. Αυτό οφείλεται σε μία σειρά φαινομένων που περιλαμβάνουν την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, την ενδοκύτωσή του και μεταφορά μέσα στο κύτταρο, και τη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα [150]. Η απευαισθητοποίηση του υποδοχέα συμβαίνει όταν μετά από μακροχρόνια διέγερση του υποδοχέα, η μεταγωγή του μηνύματος εξασθενεί. Είναι ένας μηχανισμός που ρυθμίζει τη δραστηριότητα του υποδοχέα, περιλαμβάνει τη λειτουργική αποσύνδεσή του από τις G-πρωτεΐνες και οφείλεται στη φωσφορυλίωσή του από φωσφορικές κινάσες. Η ενδοκύτωση και μεταφορά του υποδοχέα εντός του κυττάρου γίνεται σε χρόνους που ποικίλουν από την έκθεση στον αγωνιστή. Συγκεκριμένα, όσο αφορά τους CB1Rs, μετά την ενεργοποίησή τους, υφίστανται φωσφορυλίωση και ενδοκύτωση, η οποία ενδέχεται να ακολουθείται από ανακύκλωση του υποδοχέα στη μεμβράνη [151]. Ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας ενδοκυτώνεται με τη βοήθεια κυστιδίων κλαθρίνης και



μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα [152]. Εκεί αποφωσφορυλιώνεται και επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό ότι οι GPCRs δε λειτουργούν μόνο ως μονομερή, αλλά ο διμερισμός ή ο ολιγομερισμός τους απαιτείται για τη μεταγωγή σήματος. Οι GPCRs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν διμερή ή ολιγομερή [153], αλλά και μέλη των GPCRs που ανήκουν σε διαφορετική οικογένεια, όπως για παράδειγμα CB1Rs και υποδοχείς οπιοειδών [154], είναι δυνατό να αλληλεπιδράσουν και να δώσουν ετεροδιμερή ή ετεροπολυμερή. Ο διμερισμός/ολιγομερισμός των GPCRs καθορίζει ένα νέο επίπεδο μοριακής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις διάφορες οικογένειες των GPCRs, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται. Δείχθηκε με χρήση ανοσοϊστοχημείας ότι και οι CB1Rs είναι ικανοί να δημιουργήσουν ομο- ή ετεροδιμερή *in vivo* [155]. Ενδέχεται δε τα CB1R διμερή να είναι η κυρίαρχη λειτουργική μονάδα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σε αυτόν το διμερισμό του υποδοχέα ίσως να αποδίδεται η σύνδεση με τις  $G_q$  πρωτεΐνες πέραν των  $G_{i/o}$ , στην οποία πιθανά οφείλεται η μεσολαβούμενη από τον CB1R κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε NG108-15 κύτταρα νευροβλαστώματος [156]. Επιπλέον, όπως θα δειχτεί αναλυτικότερα στη συνέχεια του κεφαλαίου, και όπως προκύπτει από τα δεδομένα των ερευνητικών μας πειραμάτων, οι CB1Rs είναι δυνατό να ενεργοποιούν διάφορους άλλους τύπους υποδοχέων (διενεργοποίηση), και συγκεκριμένα υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs), δράση με την οποία εμπλέκονται και σε επιπλέον σηματοδοτικά μονοπάτια.

#### 1.4.2. Ρύθμιση κλασσικών οδών μεταγωγής σήματος

##### *Ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης*

Η αναστολή της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης (AC) μετά από ενεργοποίηση των CBRs, αποτελεί την πρώτη καλά μελετημένη και χαρακτηρισμένη οδό μεταγωγής σήματος και έχει δειχθεί τόσο σε νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τον CB1R, όσο και σε λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον CB2R [18,157-159]. Αναστολή της ενεργοποίησης της AC οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής του κυκλικού AMP (cAMP). Η ελάττωση αυτή αναστέλλεται από την τοξίνη του κοκκύτη, υποδηλώνοντας τη συμβολή των  $G_{i/o}$  πρωτεϊνών σε αυτή τη δράση [157].

Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη του cAMP είναι καθοριστικής σημασίας για συγκεκριμένους τύπους μνήμης και μάθησης [160]. Αλλαγές στη συναπτική πλαστικότητα που επάγονται από το cAMP συμβάλλουν στο σχηματισμό της μνήμης [161-162]. Οι Kim και Thayer [58], από την άλλη, έδειξαν ότι η παρεμπόδιση του σχηματισμού νέων συνάψεων επάγει την εξασθένηση της μνήμης. Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, η αναστολή της AC από τα κανναβινοειδή πιθανά συσχετίζεται με τα γνωσιακά ελλείμματα που παρατηρούνται μετά τη χρήση κάνναβης. Έχει, ωστόσο, αναφερθεί ότι ενεργοποίηση του CB1R οδηγεί και σε ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, προτείνοντας ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ο CB1R συνδέεται με  $G_s$  πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως [142]. Ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης παρατηρείται, επίσης, όταν CB1 και ντοπαμινεργικοί  $D_2$  υποδοχείς ενεργοποιούνται ταυτόχρονα [141], πιθανά ως αποτέλεσμα ετεροδιμερισμού των δύο αυτών τύπων υποδοχέων [163].

Το cAMP αποτελεί δεύτερο αγγελιαφόρο, που δρα σαν αλλοστερικός τροποποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Η ενεργοποιημένη κινάση με τη σειρά της θα φωσφορυλιώσει πολλά υποστρώματα (κινάσες, φωσφατάσες, υποδοχείς, διαύλους ιόντων, μεταγραφικούς παράγοντες κλπ.), οδηγώντας είτε στην ενεργοποίησή τους είτε στην απενεργοποίησή τους. Η ελάττωση της παραγωγής του cAMP που διαμεσολαβείται από τα κανναβινοειδή προκαλεί τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της PKA.

#### *Ρύθμιση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK)*

Ενεργοποίηση των CB1Rs οδηγεί σε διέγερση της φωσφορυλίωσης της FAK [164-165]. Η διέγερση αυτή μεσολαβείται και εξαρτάται από την ενεργοποίηση της  $G_i$  πρωτεΐνης με την συνακόλουθη αναστολή της παραγωγής cAMP και αναστολή της ενεργοποίησης της AC. Η FAK προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό [166] και γι' αυτό το λόγο μπορεί να σχετίζεται με τη συναπτική πλαστικότητα.

#### *Ρύθμιση διαύλων ιόντων*

Διέγερση των CB1Rs ενεργοποιεί τους διαύλους καλίου εσωτερικής ανόρθωσης που είναι συζευγμένοι με  $G$  πρωτεΐνες ( $G$  protein-coupled inwardly rectifying potassium channels, GIRKs) μέσω των ευαίσθητων στην τοξίνη του κοκκύτη  $G_{i/o}$  πρωτεϊνών [138,167] και η ενεργοποίηση αυτή επάγεται από διαφορετικούς αγωνιστές του CB1 υποδοχέα. Σε κύτταρα της ωοθήκης του *Xenopus laevis* έχει αναφερθεί



ενεργοποίηση των GIRK1 και GIRK4 [167-168], ενώ παρόμοια ενεργοποίηση έχει επίσης ανιχνευθεί και σε νευρικά κύτταρα [169].

Μια μελέτη των Garcia et al. [170] έδειξε ότι η προκαλούμενη από WIN 22,212-2 ενεργοποίηση των διαύλων GIRK σε AtT-20 κύτταρα που υπερεκφράζουν το CB1R μπορεί να προληφθεί από ενεργοποίηση της PKC. Το εύρημα ότι μία μετάλλαξη στο CB1 υποδοχέα είναι ικανή να αναστείλει την προκαλούμενη από την PKC διακοπή της ενεργοποίησης των διαύλων υποδεικνύει ότι φωσφορυλίωση του υποδοχέα ίσως να αναστέλλει τη δραστηριότητά του [170]. Έτσι, η διέγερση της PKC πιθανά να αποτελεί ένα μηχανισμό για την αποκατάσταση της νευρωνικής διεγερσιμότητας και της συναπτικής ισχύος όταν τα επίπεδα των ενδοκανναβινοειδών είναι υψηλά.

Οι CB1 υποδοχείς επηρεάζουν επιπλέον τη λειτουργία των τασοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου (voltage-gated calcium channels). Αναστολή των L-τύπου διαύλων ασβεστίου μετά από διέγερση με κανναβινοειδή ανιχνεύθηκε σε αρτηριακά λεία μυϊκά κύτταρα φλοιού γάτας [171] και σε κύτταρα του πυρήνα της μονήρους δεσμίδας προερχόμενα από έμβρυο επίμου [172], ενώ ενεργοποίηση των διαύλων αυτών αναφέρθηκε σε N18TG2 κύτταρα [173]. Αναστολή των N-τύπου διαύλων ασβεστίου μέσω  $G_{i/o}$  ανιχνεύθηκε σε ένα μεγάλο αριθμό πειραμάτων [137,169,174], και η δράση αυτή πιθανά να παίζει ρόλο στην προσυναπτική αναστολή και την ανάδρομη σηματοδότηση που επάγεται από τα κανναβινοειδή [67,175]. P και Q-τύποι διαύλων ασβεστίου, επίσης, ρυθμίζονται αρνητικά από τους CB1Rs μέσω ευαίσθητων σε PTX G πρωτεϊνών [138,174].

Η ενεργοποίηση των GIRK διαύλων και η αναστολή των διαύλων ασβεστίου μέσω διέγερσης των προσυναπτικών CB1Rs ενδεχομένως αποτελούν δύο ξεχωριστούς μηχανισμούς για την αναστολή της απελευθέρωσης νευροβιαβιαστών (όπως γλουταμικό οξύ) από τις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις [73,176]. Στον ιππόκαμπο, η προσυναπτική αναστολή που διαμεσολαβείται από τους CB1Rs έχει σχετισθεί με την ικανότητα των κανναβινοειδών να αναστέλλουν την μακροχρόνια ενδυνάμωση [74] επηρεάζοντας έτσι τη μνήμη και τη μάθηση.

#### *Πρόσδεση της β-αρρεστίνης στον CB1 υποδοχέα*

Οι β-αρρεστίνες αναγνωρίστηκαν αρχικά σαν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απευαισθητοποίηση των GPCRs. Μόλις ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας, οι β-αρρεστίνες φωσφορυλιώνονται από τις GPCR κινάσες (GRKs). Αμέσως μετά προσδένονται στους υποδοχείς και επάγουν την ενδοκύτωσή τους, ενώ ταυτοχρόνως μπορούν να

αποτελέσουν «πρωτεΐνες ικριώματα» (scaffolding proteins) για τη δημιουργία σηματοδοτικών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων (signaling complexes) [177]. Οι μηχανισμοί της πρόσδεσης της β-αρρεστίνης στους διάφορους GPCRs διαφέρουν μεταξύ τους.

Ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τις ιδιότητες της πρόσδεσης της β-αρρεστίνης στους υποδοχείς των κανναβινοειδών. Αρκετές αναφορές υποδηλώνουν το ρόλο της β-αρρεστίνης στην απευαισθητοποίηση των CB1Rs τόσο στον εγκέφαλο όσο και σε ωκύτταρα [178-180]. Έχει δειχθεί ότι η έκφραση της β-αρρεστίνης και της GRK3 σε ωκύτταρα *Xenopus* επιταχύνει την απευαισθητοποίηση των CB1Rs [178]. Παράλληλα δείχθηκε ότι η έκφραση επικρατούς αρνητικού μεταλλάγματος των GRK και της β-αρρεστίνης επηρεάζει την απευαισθητοποίηση των CB1Rs σε νευρώνες ιπποκάμπου [179]. Τα αμινοξέα S426 και S430 εντοπίστηκαν ως υπεύθυνα για την εξαρτώμενη από τη β-αρρεστίνη απευαισθητοποίηση του CB1R [178]. Μεταλλάξεις των αμινοξέων αυτών δεν προκάλεσαν αλλαγή στην εσωτερίκευση του υποδοχέα σε AtT20 και HEK283 κύτταρα [181]. Συγκεκριμένα, οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι, τόσο οι αγρίου τύπου υποδοχείς όσο και οι μεταλλαγμένοι στα αμινοξέα S426/ S430 CB1Rs, επιστρατεύουν β-αρρεστίνες σε HEK283 κύτταρα μετά από ερεθισμό με CP 55,940. Αντίθετα, η παρουσία σερίνης και θρεονίνης στο καρβοξυλικό άκρο των CB1Rs μετέχει τόσο στην εσωτερίκευση των υποδοχέων όσο και στην πρόσδεσή τους με τις β-αρρεστίνες [182]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι διαφορετικά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για τη μεσολαβούμενη από β-αρρεστίνες απευαισθητοποίηση και εσωτερίκευση του CB1 υποδοχέα, ενώ έχει επίσης δειχθεί ότι η απευαισθητοποίηση του υποδοχέα από τις β-αρρεστίνες πιθανά να εξαρτιέται και από τον τύπο του αγωνιστή [180]. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι οι β-αρρεστίνες συμμετέχουν στη απευαισθητοποίηση του CB1R και, πιθανά, και στην εσωτερική του, αν και η τελευταία υπόθεση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

#### **1.4.3. Μεταγωγή σήματος μέσω της ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK)**

Μετά από διέγερση των GPCRs είναι συχνή η ενεργοποίηση του μονοπατιού της ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAP kinase, MAPK). Η «διασταυρούμενη επικοινωνία» (crosstalk) μεταξύ τους μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω διενεργοποίησης (transactivation) είτε μέσω δευτέρων αγγελιαφόρων, και συντονίζεται από «πρωτεΐνες ικριώματα» (scaffolding



proteins), προσαρμογείς (adaptors) και ειδικές μικροπεριοχές (microdomains) της πλασματικής μεμβράνης. Οι κινάσες τυροσίνης, για παράδειγμα, αποτελούν άμεσους τελεστές-ικριώματα των πρωτεϊνών G [183-184].

Οι MAP κινάσες είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης μέσω των οποίων οι GPCRs μπορούν να εμπλακούν στη ρύθμιση κυτταρικών δραστηριοτήτων όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η απάντηση στο stress, η κινητικότητα και ο κυτταρικός θάνατος. Αποτελούν μια υπεροικογένεια κινάσων με τέσσερις διαφορετικές υποοικογένειες: 1. τις ρυθμιζόμενες από εξωκυτάρια σήματα κινάσες ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2), 2. τη c-Jun κινάση (c-Jun N-terminal kinase (JNK); κινάση συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της Jun), 3. την p38 MAPK και 4. την ERK5. Το πιο καλά μελετημένο μονοπάτι MAPK είναι εκείνο των ERK1/2 και συχνά ο όρος αναφέρεται σε αυτές (p44 MAPK και p42 MAPK αντιστοιχούν σε ERK1 και ERK2, αντίστοιχα). Το μονοπάτι των ERK1/2 ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη Ras. Οι MAPK σηματοδοτικοί καταρράκτες είναι ιεραρχικά οργανωμένοι καθώς οι MAP κινάσες ενεργοποιούνται από τις MAPK κινάσες (MAPKKs), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από τις MAPKK κινάσες (MAPKKKs). Οι MAPKKKs ενεργοποιούνται από μικρές GTPάσες ή άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Η οικογένεια των μικρών GTPασών περιλαμβάνει αρκετά μέλη από τα οποία τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ανήκουν στην οικογένεια Ras ή στην οικογένεια Rho. Υπάρχουν διάφορα μέλη MAPKKKs και MAPKKs από τα οποία, για παράδειγμα, η MAPKKK Raf και οι MAPKKs MEK1/2 μετέχουν στην ενεργοποίηση των ERK1/2.

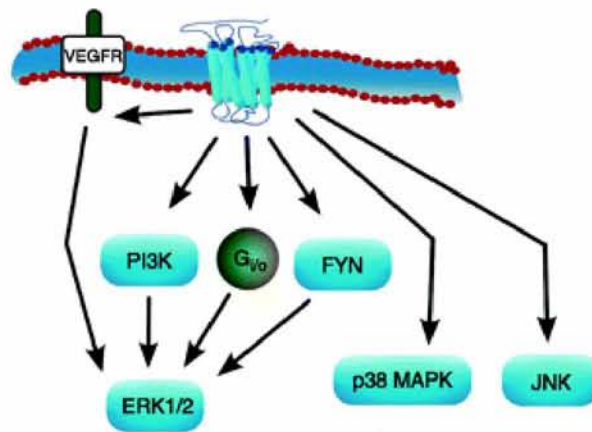
Οι MAPKs μπορούν να ενεργοποιηθούν από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (RTKs), από υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) με τη μεσολάβηση των G πρωτεϊνών ή και μηχανισμούς ανεξάρτητους από τις G πρωτεΐνες. Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που πυροδοτούνται από GPCRs και επάγουν ενεργοποίηση της MAPK παρουσιάζουν αρκετές διαφορές ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους. Όλες οι υπομονάδες των G πρωτεϊνών  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_s$ ,  $G_{12/13}$  και οι Gβγ, ενεργοποιούν τις Ras και Rho GTPάσες ή/και τη Raf κινάση, άμεσα ή έμμεσα μέσω συμπλόκων σηματοδότησης ή δεύτερων αγγελιαφόρων, και ως εκ τούτου οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK [ανασκοπήσεις 185-186]. Έχουν βρεθεί πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους οι GPCRs ενεργοποιούν τον καταρράκτη της ERK χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό τελεστών (effectors) και σηματοδοτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών που συγκλίνουν στην ενεργοποίηση της Raf. Οι τελεστές αυτοί περιλαμβάνουν την πρωτεϊνική κινάση C



(PKC), την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), τη Src ή τη διενεργοποίηση υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης (RTKs) που εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως ο EGFR και ο FGFR, και επάγουν φωσφορυλίωση της ERK [185,187-191]. Συγκεκριμένα, η  $G_{\alpha_q}$  μπορεί να ενεργοποιήσει τις κινάσες τυροσίνης Src και Pyk2 που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη Ras. Μέσω της PLC- $\beta$ , η  $G_{\alpha_q}$  και η  $G_{\beta\gamma}$  ενεργοποιούν την PKC που ενεργοποιεί τη Raf. Με την αύξηση του cAMP από τη  $G_{\alpha_s}$  ενεργοποιείται η PKA, καταλήγοντας σε ενεργοποίηση της Raf. Η  $G_{\alpha_s}$  μπορεί, επίσης, να σχηματίσει σύμπλοκα με τις αρρεστίνες και τη Src που να έχουν ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση της ERK/MAPK οδού ανεξάρτητα από το cAMP. Τέλος, πιο κλασσικά η  $G_i$  πρωτεΐνη ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK/ERK μέσω της  $G_{\beta\gamma}$  υπομονάδας και η  $G_o$  μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από την PKC αλλά ανεξάρτητου από τη Ras [185-186].

Ανάλογα με άλλους GPCRs, διέγερση του CB1 υποδοχέα με διάφορους αγωνιστές έχει βρεθεί να οδηγεί σε ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους τόσο *in vitro* [192-195] όσο και *in vivo* σε ιστούς ιππόκαμπου, παρεγκεφαλίδας, και στο κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα επίμου [196-197], χωρίς ωστόσο ο μηχανισμός αυτής της επαγωγής να είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Μέχρι τώρα, τα κανναβινοειδή έχουν βρεθεί να ενεργοποιούν την ERK με τους ακόλουθους τρόπους: 1. τη συσσώρευση κεραμιδίου σε U373 MG κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος [198], 2. την ενεργοποίηση του PI3K/PKB μονοπατιού σε U373 MG κύτταρα και PC-3 κύτταρα προστάτη [193,199], 3. την cAMP και την Fyn κινάση τυροσίνης στον ιππόκαμπο [196], 4. την αναστολή της PKA στα NIE-115 κύτταρα νευροβλαστώματος μυός [194], και τέλος, 5. την PKC και τη διενεργοποίηση του VEGFR στα N18TG2 κύτταρα νευροβλαστώματος [195] ή τη διενεργοποίηση του EGFR σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές [200], μηχανισμός που θα αναλυθεί στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο (**Εικ.5**). Αντίστοιχα με την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών, η διέγερση των ERK1/2 εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και διαφαίνεται ότι διαφορετικοί αγωνιστές ενεργοποιούν την ERK1/2 μέσω διαφορετικών οδών.

Καθώς η σύνδεση με τους παραπάνω σηματοδοτικούς τελεστές έχει λάβει χώρα σε μη νευρωνικές κυτταρικές σειρές, η προκαλούμενη από το CB1R ενεργοποίηση της ERK έχει συσχετιστεί με λειτουργίες όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετασχηματισμό, επιβίωση αλλά και απόπτωση [192-193]. Επομένως, το ερώτημα που τίθεται και χρειάζεται να απαντηθεί αφορά το πώς η σηματοδότηση του CB1 υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση της ERK σε νευρώνες του ΚΝΣ.



**Εικόνα 5.** Ενεργοποίηση διαφορετικών MAPK μονοπατιών μέσω του CB1R.

Τη διέγερση του CB1R ακολουθεί συχνά ενεργοποίηση των p38 MAPK και JNK (**Εικ.5**) [201-203], μέσω  $G_{\beta\gamma}$ , PI3K και Ras εξαρτώμενου μηχανισμού, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συμμετέχει και η διενεργοποίηση του PDGF [202]. Ωστόσο, η ενεργοποίησή τους από κανναβινοειδή δε συμβαίνει καθολικά όπως η ενεργοποίηση της ERK, αλλά εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και τους αγωνιστές. Όσον αφορά την ενεργοποίηση των p38 MAPK και JNK σε νευρωνικό περιβάλλον, οι διαφορές τους πιθανά υποδεικνύουν την ωρίμανση των νευρικών κυττάρων ως βασική προϋπόθεση για τα μονοπάτια αυτά [204].

#### 1.4.4. Αλληλεπίδραση CB1 υποδοχέων με υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) και συντονισμός της σηματοδότησης στις λιπιδικές σχεδίες

Κυτοπλασματικές τυροσινικές κινάσες ή διαμεμβρανικοί υποδοχείς με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (RTKs), έχουνδειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από GPCRs, καθώς διάφοροι αγωνιστές των GPCRs επάγουν οξεία ενεργοποίηση της Src [184,187,205-207] ή διενεργοποίηση των RTKs [188,191,208]. Και οι δύο τύποι κινάσων τυροσίνης, όπως προαναφέρθηκε, έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος του CB1R.

Συγκεκριμένα για τους RTKs, η αλληλεπίδρασή τους με το CB1R περιγράφηκε για πρώτη φορά σε κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ (Chinese hamster ovary cells, CHO cells), διαμολυσμένα με το CB1R και με υποδοχείς ινσουλίνης ή IGF1 [209]. Εν



συνεχία, και οι υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs) βρέθηκαν να συνδέονται με τη μεταγωγή σήματος από κανναβινοειδή για να επάγουν ενεργοποίηση της ERK σε καρκινικές κυτταρικές σειρές [200]. Επιπλέον, τα ευρήματα άλλων μελετών κατέδειξαν διενεργοποίηση του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) από το CB1R στα N18TG2 κύτταρα νευροβλαστώματος [195], καθώς και ένα εξαιρετικά σημαντικό επίπεδο «διασταυρούμενης επικοινωνίας» του CB1R με τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR) που επάγει επιμήκυνση του άξονα νευρώνων προερχόμενων από πυρήνες της παρεγκεφαλίδας επίμυ [210]. Οι FGFR1 και FGFR2 αποτελούν τους κυρίαρχους τύπους FGF υποδοχέων στους αναπτυσσόμενους νευρώνες, και, όπως στην περίπτωση του CB1R, η ενεργοποίησή τους επάγει νευριτική ανάπτυξη [211]. Η αλληλεπίδραση αυτή ανάμεσα στους υποδοχείς έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός που συνδέει τους GPCRs με την ενεργοποίηση της ERK [212-214] και έχει βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Η επαγόμενη από GPCRs διενεργοποίηση των RTKs συνήθως προϋποθέτει κινήσεις τυροσίνης της οικογένειας των Src, ενώ η εξάρτησή της από την κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$ , τις  $G_{i/o}$  ή  $G_q$  υπομονάδες των  $G\alpha$  πρωτεϊνών και τις  $G\beta\gamma$ , ή τη δραστηριότητα της PKC φαίνεται να είναι ειδική ανάλογα με τον υποδοχέα, τον κυτταρικό τύπο ή το πρόσδεμα. Η επαγόμενη από πρόσδεμα οργάνωση ενός ετεροτυπικού GPCR-RTK πολυπρωτεϊνικού σηματοδοτικού συμπλόκου, επιπλέον της ενίσχυσης και του πολλαπλασιασμού της σηματοδότησης μέσω τελεστών που βρίσκονται καθοδικά, πιθανά να συμβάλει στην ενδοκύτωση και στη μετακίνηση του υποδοχέα [213,215].

Αυτός ο σύνθετος συντονισμός των μεμβρανικών υποδοχέων που εξυπηρετεί τη νευροδιαβίβαση, την ανάπτυξη, ή την πολικότητα, διευκολύνεται από ειδικές μικροπεριοχές της μεμβράνης, και ειδικότερα τις λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts). Οι λιπιδικές σχεδίες αποτελούν αυστηρά διαμορφωμένες μικροπεριοχές της μεμβράνης που συγκροτούνται από χοληστερόλη, γλυκοσφιγγολιπίδια, και GPI πρωτεΐνες (glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins), στις οποίες οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς μπορεί να συσσωρεύονται επί εξωτερικών ερεθισμών, όπως πρόσδεση αγωνιστή, προκειμένου να επάγουν ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος. Σε αυτό συνδράμει ο εμπλουτισμός της κυτταροπλασματικής πλευράς των λιπιδικών σχεδιών σε μόρια που μετέχουν στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, όπως κινήσεις της οικογένειας Src, πρωτεΐνες G και μικρές GTPάσες, μόρια-συνδέτες προσδεμένα στις σχεδίες μέσω των λιπιδικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεών τους [216-218]. Μετά από σηματοδότηση του μεμβρανικού υποδοχέα και του επακόλουθου



καταρράκτη φωσφορυλιώσεων, οι πρωτεΐνες αυτές τροποποιούνται και αποκτούν προσωρινά νέες χημικές συγγένειες (affinities) και ρυθμούς διάχυσης που ρυθμίζονται περαιτέρω από τον κυτταροσκελετό ινιδώδους ακτίνης (F-actin) και της συνδεόμενες πρωτεΐνες [219]. Η μεταγωγή σήματος από το CB1 υποδοχέα πιθανά να ρυθμίζεται από τις λιπιδικές σχεδίες [220], ωστόσο η τοπολογία και οι εγγύς σηματοδοτικοί «συνεργάτες» του σε σχέση με τις λιπιδικές σχεδίες δεν έχουν καθοριστεί [221] και αποτελούν έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης.

### **1.5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ERK-MAPK ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ CB1R ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

Η ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση, όπως υποδηλώνει και το όνομά της, αρχικά ανακαλύφθηκε ως σημαντικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης. Μεταγωγή σήματος μέσω της ενεργοποίησης του ERK MAPK καταρράκτη κατευθύνει τη νευρογένεση, ενώ παράλληλα καταστέλλει τη γλοιογένεση [222]. Το μέγεθος και η διάρκεια της ενεργοποίησης της ERK σε νευρώνες και νευρικά κύτταρα έχουν αιτιολογικά συνδεθεί με συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις, με την παροδική ενεργοποίηση (<10 λεπτά) να επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παρατεταμένη, ηπιότερη ενεργοποίηση να προκαλεί νευριτική επέκταση (neurite outgrowth) και διαφοροποίηση [223-224]. Συγκεκριμένα, χαμηλά επίπεδα ERK2 έχουν συσχετιστεί άμεσα με μείωση του πάχους του φλοιού που αποδίδεται σε εξασθένιση του πολλαπλασιασμού πρόδρομων νευρικών κυττάρων και με δημιουργία λιγότερων νευρώνων [225]. Καθώς, όμως, οι ERKs βρέθηκαν να εκφράζονται σε αφθονία στους νευρώνες του ώριμου ΚΝΣ, προέκυψε το ερώτημα για ποιο λόγο οι μοριακοί αυτοί μηχανισμοί της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης να είναι παρόντες στους όχι πια διαιρούμενους και άρα ήδη διαφοροποιημένους νευρώνες. Τα ευρήματα πολλών ερευνών συνδέουν το σηματοδοτικό σύστημα των ERK1/2 στους ώριμους νευρώνες με τη συναπτική πλαστικότητα, τη μάθηση και τη μνήμη [225-228], ενώ καλά εδραιωμένος είναι και ο ρόλος της ERK οδού στη μεταγραφική [229-230] και μεταφραστική ρύθμιση [228], αλλά και στη νευρωνική επιβίωση [231].

Ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (LTP), η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί μια σθεναρή και μακράς διάρκειας μορφή συναπτικής πλαστικότητας που συντελεί στη μνήμη και τη μάθηση. Συγκεκριμένα, ερεθίσματα που επάγουν την LTP στη CA1 περιοχή του ιππόκαμπου, έχουν επίσης βρεθεί να ενεργοποιούν δραστικά και τη MAPK [230,232], ενώ φαρμακολογική αναστολή της ενεργοποίησης της MEK που προηγείται της ERK, αναστέλλει μερικώς τη δημιουργία LTP στη CA1 περιοχή του ιππόκαμπου [232]. Περαιτέρω δεδομένα έχουν, επίσης, καταδείξει την αναγκαιότητα της ενεργοποίησης της ERK για την επαγωγή της LTP στην οδοντωτή έλικα επίμυ τόσο *in vitro* [233] όσο και *in vivo* [234].

Η μακροχρόνια ενδυνάμωση μπορεί να είναι είτε βραχύχρονου τύπου και να εξαρτάται από την ενεργοποίηση κινασών και φωσφατασών (Early E-LTP) είτε

μακρόχρονου τύπου και να χρειάζεται μεταγραφή mRNA και σύνθεση πρωτεϊνών (Late L-LTP). Πράγματι, το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK, πέραν του να ρυθμίζει τη βραχύχρονη συναπτική ισχύ, έχει δειχθεί να κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο μεταγραφικών και μεταφραστικών γεγονότων που απαιτούνται για την L-LTP και την εδραίωση της μνήμης [228,230].

Η ανακάλυψη ότι η ενεργοποίηση της ERK οδού είναι αναγκαία για τη συναπτική πλαστικότητα *in vitro* οδήγησε στην αξιολόγηση του ρόλου της ενεργοποίησης του εν λόγω μονοπατιού στη μάθηση *in vivo*. Εν συντομία, ενεργοποίηση της ERK έχει βρεθεί να συνδέεται με συνειρμική (associative learning) και χωρική μάθηση (spatial learning). Κλασσική δοκιμασία εξάρτησης φόβου βάσει πλαισίου (contextual fear conditioning) σε τρωκτικά υποδεικνύει ενεργοποίηση της MAPK στον ιππόκαμπο [235]. Σε αυτή τη δοκιμασία - όπου κατά την εκπαίδευση ένας συγκεκριμένος ηχητικός τόνος (εξαρτημένο ερέθισμα) συνδέεται με αιφνίδια ηλεκτροπληξία (ανεξάρτητο ερέθισμα), ενώ μετά το πέρας μίας ώρας από την εκπαίδευση ακολουθεί μόνο ο τόνος για την αξιολόγηση της συνειρμικής μάθησης που εκφράζεται με αντίδραση φόβου - βρέθηκε μια σημαντική αύξηση στην ενεργοποίηση τόσο της ERK1 όσο και της ERK2. Η ενεργοποίηση αυτή δεν ανιχνεύθηκε σε πειραματόζωα που τους παρουσιαζόταν ο τόνος αλλά δεν είχε προηγηθεί σύνδεση με την ηλεκτροπληξία, υποδηλώνοντας την άμεση συσχέτιση της ενεργοποίησης της ERK με τη συνειρμική μάθηση [235]. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τόσο η βλάβη της ERK2 στον τελεγκέφαλο [225], αλλά και η έκφραση μεταλλαγμένων μορφών της MEK οι οποίες αδρανοποιούν τη φυσική πρωτεΐνη (dominant negative), προκαλούν ελλείμματα στην εξαρτημένη μάθηση φόβου βάσει πλαισίου [236]. Αντίστοιχα, σε τρωκτικά που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου του Morris, για την εκτίμηση της χωρικής τους μάθησης, φαρμακολογική αναστολή της MEK ανέστειλε τις ικανότητες χωρικής μάθησης των πειραματόζωων, ενώ δεν υπήρχε καμία επίδραση στη φυσική ικανότητά τους να εκτελέσουν αυτή τη συμπεριφορική δοκιμασία [237]. Έτσι, και η χωρική μάθηση στα τρωκτικά με τρόπο παρόμοιο με τη συνειρμική μάθηση, περιλαμβάνει ενεργοποίηση της ERK στο ΚΝΣ, για το σχηματισμό μακροχρόνιας μνήμης.

Κυτταρικές αποκρίσεις που προάγουν νευροπροστασία και συναπτική πλαστικότητα και σχετίζονται με CB1 υποδοχείς περιλαμβάνουν ενεργοποίηση της ERK. Καθώς η ενεργοποίηση της ERK σηματοδοτικής οδού συνδέεται με την κυτταρική προστασία από θανατηφόρα ερεθίσματα, οξεία ενεργοποίηση της ERK από το CB1 υποδοχέα βρέθηκε να προστατεύει τα γλοιακά κύτταρα από την προερχόμενη από κεραμίδιο



επαγωγή του αποπτωτικού προγράμματος [193]. Η ενεργοποίηση, όμως, του CB1R μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση, ειδικότερα σε μετασχηματισμένα κύτταρα (transformed), οφειλόμενη στην ικανότητα του CB1R να επάγει παρατεταμένη παραγωγή κεραμιδίου και ενεργοποίηση της ERK [198]. Επομένως, παρόλο που βραχύχρονη ενεργοποίηση της ERK από το CB1R προστατεύει τα γλοιακά κύτταρα από απόπτωση, παρατεταμένη ενεργοποίησή της οδηγεί σε απόπτωση ή σε αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (growth arrest) [193,198].

Μακροχρόνια προγεννητική έκθεση σε WIN 55,212-2 βρέθηκε να μειώνει τη δραστηριότητα της ERK σε εγκεφαλικές περιοχές, όπως στον ιππόκαμπο, στον προμετωπιαίο φλοιό και στην οδοντωτή έλικα. Στη μείωση αυτή αποδόθηκαν τα γνωσιακά και νευροπλαστικά ελλείμματα που παρατηρούνται λόγω προγεννητικής έκθεσης σε κανναβινοειδή [238]. Η μειωμένη ενεργοποίηση της ERK, αλλά όχι της ολικής πρωτεΐνης, προτάθηκε από τους συγγραφείς ως η αιτία των μειωμένων επιπέδων νευροτροφινών σε ιππόκαμπο και μετωπιαίο φλοιό και του παρατηρούμενου ελλείμματος στη συναπτική λειτουργία [238]. Οι ERKs δεν αποτελούν μόνο απαραίτητες συνιστώσες σηματοδοτικών μηχανισμών που υποβοηθούν τη μνήμη, αλλά ρυθμίζουν τη δομή των δενδριτικών ακανθών και τη σύνθεση πρωτεϊνών (σημαντικά για το LTP), όπως επίσης και την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες-ικρίωματα σε συναπτικό επίπεδο [130].

Σε συμφωνία με τις γνωστές ανασταλτικές επιδράσεις των κανναβινοειδών στη μνήμη και τη μάθηση, χορήγηση WIN 55,212-2 σε επίμυες βρέθηκε να μειώνει τη μαθημένη αντίδραση φόβου στο εξαρτημένο ερέθισμα σε δοκιμασία εξάρτησης φόβου βάσει πλαισίου. Σημαντικότερα, φαρμακολογική αναστολή της ενεργοποίησης της ERK ανέστειλε την προκαλούμενη από WIN 55,212-2 μείωση της αντίδρασης φόβου [239], υποδηλώνοντας άμεσα την ανάμειξη του μονοπατιού της ERK στα προκαλούμενα από το CB1 υποδοχέα γνωστικά και μνημονικά ελλείμματα.

Συμπερασματικά, ο καταλυτικός ρόλος της MAPK ERK οδού στη νευροπροστασία, τη συναπτική πλαστικότητα και το σχηματισμό της μακρόχρονης μνήμης σε συνδυασμό με την τροποποίηση των δράσεων των κανναβινοειδών στο ΚΝΣ που επιφέρουν οι αλλαγές της δραστηριότητάς της, υποδεικνύουν καθαρά τη λειτουργική σημασία της ενεργοποίησης της ERK MAPK από τους CB1 υποδοχείς.

### 1.6. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ C (PKC)

Ανάμεσα στους τελεστές που χρησιμοποιούν πολλοί GPCRs, μεταξύ των οποίων και ο CB1R, για την ενεργοποίηση του καταρράκτη της ERK, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) εμφανίζει εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας του καθοριστικού ρόλου της στη συναπτική πλαστικότητα και σε πολλούς τύπους μνήμης και μάθησης. Η σηματοδοτική οδός της PKC συμμετέχει ρυθμιστικά σε μια ευρεία κλίμακα ζωτικών βιολογικών λειτουργιών, όπως τον πολλαπλασιασμό, το νευρωνικό τραυματισμό, τη συναπτική αναδόμηση και επανόρθωση, τη συναπτογένεση, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση, και την ογκογένεση.

Ο σημαντικός ρόλος των ισομορφών της PKC στον έλεγχο της σχετικής με τη μνήμη επεξεργασίας μεταγωγής σήματος είναι καλά εδραιωμένος. Ο εγκέφαλος, και συγκεκριμένα οι κρίσιμες για τη γνώση και τη ρύθμιση της διάθεσης νευρικές δομές, περιλαμβάνουν της μεγαλύτερες συγκεντρώσεις PKC σε ολόκληρο το σώμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφία με εστέρα φορβόλης που ενεργοποιεί την PKC, η PKC βρέθηκε στον εγκέφαλο επίμυ να εκφράζεται σε αφθονία στο νεοφλοιό, στον ιππόκαμπο, στη μέλανα ουσία, στον επικλινή πυρήνα, στο κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα, στον έξω αμυγδαλοειδή πυρήνα, στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στην εξωτερική μοριώδη στοιβάδα του οσφρητικού λοβού [240], αλλά και στο μετωπιαίο, μετωπιαίοβρεγματικό, και βρεγματικό φλοιό [241]. Επομένως, ο εντοπισμός της PKC συνδέεται στενά με εγκεφαλικές δομές που μετέχουν στην επεξεργασία της μνήμης, ενώ παράλληλα η σχετική αυτή λειτουργική επιλεκτικότητα της ανάμειξης της PKC στη μνήμη, καθιστά πιθανή τη συμμετοχή της στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ξεκινά από το CB1R και καταλήγει στην ενεργοποίηση της ERK και στην τροποποίηση της μνήμης και της μάθησης.

Αλληλεπίδραση των κανναβινοειδών με την PKC αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1994 σε πειράματα που έγιναν *in vitro* μετά από απομόνωση της PKC από τον προσθεγκέφαλο επίμυ. Συγκεκριμένα, η Δ<sup>9</sup>-THC, αλλά και η κανναβινόλη και κανναβιδιόλη, βρέθηκαν να αυξάνουν τη δραστηριότητα της PKC σε συγκέντρωση 10 μM ή και μεγαλύτερη [242]. Στην ίδια μελέτη οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η PKC ενεργοποιείται από τα κανναβινοειδή μέσω ενός μηχανισμού που πιθανά περιλαμβάνει αλληλεπίδρασή τους με λιπίδια. Στη συνέχεια, μελέτες με φαρμακολογικούς αναστολείς της PKC κατέδειξαν επιπλέον τη συμμετοχή της PKC στην επαγόμενη από κανναβινοειδή εισροή Ca<sup>2+</sup> και ενεργοποίηση της ERK σε κύτταρα από νευροβλάστωμα [195], χωρίς ωστόσο να έχει διασαφηνιστεί ποια μέλη



της οικογένειας της PKC συμμετέχουν και πώς στη μεταγωγή σήματος που επάγει η διέγερση του CB1 υποδοχέα.

### 1.6.1. Οικογένεια Πρωτεϊνικών Κινασών C: Ενεργοποίηση και λειτουργία

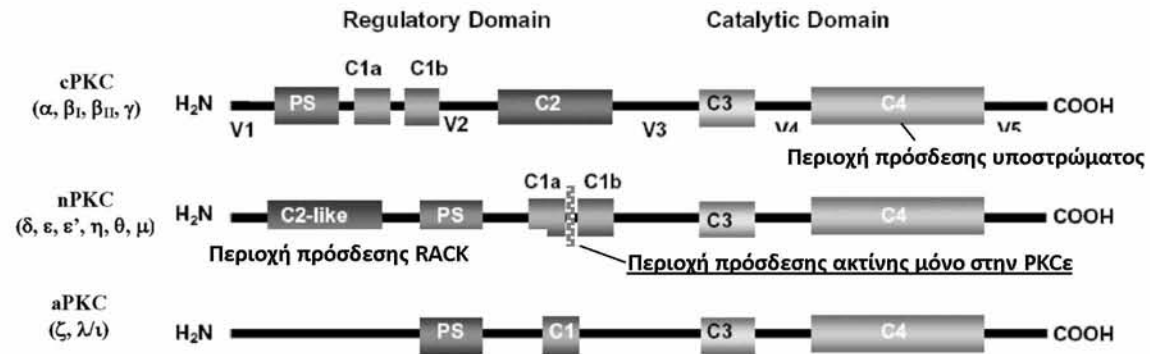
Η οικογένεια των PKC αποτελείται από τουλάχιστον δώδεκα ισομορφές. Η ενεργός περιοχή τους εντοπίζεται στο καρβοξυλικό άκρο (C-terminus) και επάγει φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης των πρωτεϊνών-στόχων. Οι PKC ισομορφές ταξινομούνται σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη δομή τους και την απαίτησή τους για συγκεκριμένο συμπράγοντα:

1. τις κλασσικές cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{II}$ , και  $\gamma$ ), οι οποίες ενεργοποιούνται από διακυλογλυκερόλη (DAG) και ασβέστιο,
2. τις νεοφανείς nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  και  $\mu$ ), οι οποίες ενεργοποιούνται από διακυλογλυκερόλη αλλά όχι από ασβέστιο, και
3. τις άτυπες aPKCs ( $\zeta$  και  $\iota$ ), οι οποίες δεν ανταποκρίνονται ούτε στη διακυλογλυκερόλη ούτε στο ασβέστιο.

Κάθε μια από αυτές τις ισομορφές περιέχει μια αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή (regulatory, REG) και μια καρβοξυτελική με δύο καταλυτικές περιοχές (catalytic, CAT) με δραστηριότητα κινάσης (**Εικ.6**). Οι διαφορές στη δομή ανάμεσα στις PKC ισομορφές αφορούν κυρίως τη ρυθμιστική τους περιοχή. Οι ρυθμιστικές περιοχές όλων των PKC ισομορφών περιέχουν μια περιοχή ψευδοϋποστρώματος (PS), μια αυτοανασταλτική περιοχή με αλληλουχίες παρόμοιες με αυτές των υποστρωμάτων των PKC ισομορφών που διατηρεί το ένζυμο σε αδρανή κατάσταση, προφανώς αλληλεπιδρώντας με την περιοχή πρόσδεσης για τα υποστρώματα στην καταλυτική περιοχή [243]. Οι cPKCs περιέχουν δύο βασικές ρυθμιστικές περιοχές, την C1 περιοχή πρόσδεσης του ενεργοποιητή (activator binding domain) και τη C2 περιοχή που αντιστοιχεί στη θέση πρόσδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$ . Οι nPKCs δεν περιέχουν τη C2 περιοχή πρόσδεσης  $\text{Ca}^{2+}$  αλλά μία παρόμοια με τη C2 περιοχή που πιθανά συνδέεται με την αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Οι cPKCs και οι nPKCs περιέχουν τις C1a και C1b υπομονάδες που επιτρέπουν την ενεργοποίησή τους από διακυλογλυκερόλη και εστέρες φορβόλης. Οι aPKCs, όμως, περιέχουν μία μόνο C1 μονάδα για την πρόσδεση της φωσφατιδυλοσερίνης. Οι aPKCs, όπως και οι nPKCs, δεν περιέχουν τη C2 περιοχή πρόσδεσης  $\text{Ca}^{2+}$  και φαίνεται να έχουν μεγαλύτερους δομικούς περιορισμούς για ενεργοποιητές από τις υπόλοιπες ισομορφές (**Εικ.6**) [244]. Ενδιαφέρον στις nPKCs παρουσιάζει και η θέση πρόσδεσης της ακτίνης που είναι μοναδική για την PKCε ισομορφή [245]. Με την πρόσδεση στην



ακτίνη και την τροποποίηση των πρωτεϊνών που προσδένονται στην ακτίνη, η PKCε προάγει την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων ανεξάρτητα από τη δραστικότητα της κινάσης [206,246].



Εικόνα 6. Δομή των PKC ισομορφών.

Η ρύθμιση από  $\text{Ca}^{2+}$  και διακυλογλυκερόλη συμβάλει στην αναγνώριση της PKC ως συστατικό των μεταγωγικών μονοπατιών, στην πορεία των οποίων, ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C και παράγονται οι δεύτεροι διαβιβαστές  $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3/\text{Ca}^{2+}$  και διακυλογλυκερόλη. Η ενεργοποίηση των ισομορφών PKC προϋποθέτει τη μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη από τις RACK πρωτεΐνες (υποδοχέας για ενεργοποιημένη κινάση C) και, όπως έχει πρωτοδειχθεί από τις ερευνητικές μελέτες του εργαστηρίου της Δρ. Μάγκουρα, μπορεί να συμβεί μέσω δύο μονοπατιών: Το πρώτο ξεκινά από τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος διεγείρει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C ενεργοποιώντας τη φωσφολιπάση C-γ (PLC-γ), και το δεύτερο μονοπάτι ξεκινά από μεμβρανικούς υποδοχείς G πρωτεϊνών, οι οποίοι μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C-β (PLC-β) ενεργοποιούν την PKC [187,206] όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και στην περίπτωση ενεργοποίησης της ERK MAPK από GPCRs.

Ένας μεγάλος αριθμός λειτουργιών έχει αποδοθεί στην οικογένεια των PKC. Ειδικότερα, ενεργοποίηση της PKC συνδέεται με ζωτικές αποκρίσεις, όπως ενίσχυση των δυναμικών ενεργείας που βασίζονται σε ασβέστιο, αύξηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, όπως γλουταμινικό [247], μείωση της δράσης των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου και καλίου καθώς και των εξαρτώμενων από ασβέστιο καναλιών καλίου στον ιππόκαμπο, δράσεις άμεσα σχετιζόμενες με την απαραίτητη για τη μνήμη και τη μάθηση επεξεργασία πληροφοριών [244]. Οι

λειτουργικές αυτές επιδράσεις πιθανά συνδέονται με μορφολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της συναπτικής αναδόμησης και συναπτογένεσης που επίσης επάγονται από την ενεργοποίηση της PKC. Ενεργοποίηση της PKC, για παράδειγμα, βρέθηκε να επάγει ταχεία μορφολογική πλαστικότητα σε δένδριτες και άκανθες νευρώνων ιππόκαμπου σε καλλιέργεια [248]. Πάντως, η ενεργοποίηση της PKC δεν συμμετέχει μόνο στη δημιουργία συνάψεων, αλλά και στην απώλεια συνάψεων, και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αυτό είναι εφικτό μέσα από διαφορετικές ισομορφές. Πράγματι, βρέθηκε ότι η PKC $\theta$  ισομορφή έχει ενοχοποιηθεί για την απαλοιφή συνάψεων τόσο σε προσυναπτικό όσο και σε μετασυναπτικό επίπεδο [249].

Η PKC συνδέεται με τη μακροχρόνια ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP) και τη μακροχρόνια αποδυνάμωση (Long-Term Depression, LTD) που, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν δύο μορφές συναπτικής πλαστικότητας που αφορούν τη μάθηση και τη μνήμη. Υπάρχουν πολλά ερευνητικά δεδομένα που εμπλέκουν άμεσα τη συμμετοχή των PKC ισομορφών στη μνήμη και στις αντίστοιχες με αυτή διαταραχές. Για παράδειγμα, ενεργοποίηση της PKC με Bryostatin-1 έχει βρεθεί να επιφέρει βελτίωση στη χωρική μνήμη και μάθηση του επίμου, αντίθετα με τη φαρμακολογική αναστολή της ενεργοποίησής της από τον H-7 αναστολέα που προκαλεί εξασθένιση της χωρικής μνήμης [250]. Αντίστοιχα, η συνειρμική μάθηση έχει δείχθει να επάγει τη μετατόπιση της PKC από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, που αποτελεί μια από τις πρώτες ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση της PKC «μιμείται» της βιοφυσικές επιδράσεις της συνειρμικής μάθησης σε νευρωνικό περιβάλλον [251]. Οι Wang et al. [252] έδειξαν μειωμένη δραστικότητα της PKC στη νόσο Alzheimer's. Από την άλλη, εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι υψηλά επίπεδα δραστικότητας της PKC στον προμετωπιαίο φλοιό, επίσης, έχουν βρεθεί να προκαλούν εξασθένιση της λειτουργικής μνήμης [253]. Από συνολικά τα παραπάνω, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι, αλλαγές στη δραστικότητα της PKC και μη φυσιολογική λειτουργία της ενδοκυττάριας σηματοδότησής της στους νευρώνες, παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο σε συναπτικό επίπεδο όσο και στο σχηματισμό και διατήρηση της μνήμης και της μάθησης.

Εκτός από τη συμμετοχή τους στα συστήματα διαβίβασης, στα ιοντικά κανάλια και στις συνάψεις, οι PKCs ρυθμίζουν και αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών (PKC-interacting proteins), όπως η αυξητική συσχετιζόμενη πρωτεΐνη 43 (GAP-43) και οι RACKs, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) [254]. Η πρωτεΐνη MARCKS αποτελεί



εξειδικευμένο υπόστρωμα της PKC [255] που προσδένεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω της αμινοτελικής περιοχής της που αγκυροβολεί με λιπιδιακή άγκυρα που έχει τη μορφή μυριστοϋλικού οξέος. Η φωσφορυλίωσή της χρησιμοποιείται ως δείκτης της ενεργοποίησης της PKC in vivo [256]. Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή και σε έλλειψη  $\text{Ca}^{2+}$ , η MARCKS προσδένεται σε ινίδια ακτίνης (F-ακτίνη) και επιδρά στη δημιουργία σταυροσυνδέσεων (cross linking) μεταξύ τους, δράσεις που αναστέλλονται μετά από φωσφορυλίωσή της από την PKC [257]. Αναλόγως, η MARCKS μετέχει στη μεμβρανική-κυτταροσκελετική πλαστικότητα μετά από επαγόμενη από PKC και  $\text{Ca}^{2+}$  μεταγωγή σήματος, και συγκεκριμένα, συσχετίζεται με τον επανασχηματισμό του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την προέκταση των νευρικών αξόνων [258]. Η MARCKS, συνεπώς, μπορεί να διαμορφώνει τη συνολική κατάσταση των ινιδίων ακτίνης και λειτουργεί σαν τελεστής για τη μετατροπή των εξωκυττάρων σημάτων που μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο μέσω της PKC.

#### 1.6.2. Συμμετοχή της PKCε ισομορφής σε προσυναπτικές και γνωσιακές λειτουργίες

Από όλες τις PKC ισομορφές, η PKCε είναι η κυρίαρχη ισομορφή σε νευρώνες που διαφοροποιούνται ή έχουν ήδη διαφοροποιηθεί [245,259,260], και βρίσκεται σε αφθονία στον ιππόκαμπο και στο οσφρητικό φύμα ενώ εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στον εγκεφαλικό φλοιό, τον επικλινή πυρήνα, το κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα, τον έξω διαφραγματικό πυρήνα κ.α. Τόσο η ομάδα της Δρ. Μάγκουρα όσο και άλλες ομάδες έδειξαν έκφραση της PKCε κατά την εμβρυογένεση άλλα και αργότερα, παρατηρώντας μάλιστα τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στις σημαντικές για το σχηματισμό των συνάψεων περιόδους, ενώ παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης της PKCε βρέθηκαν να συσχετίζονται απόλυτα με το επίπεδο της νευρωνικής δραστηριότητας [259,261]. Εξίσου σημαντικά, ανοσοαντίδραση της PKCε έχει δειχθεί στις νευρικές ίνες και παρατήρηση μικροσκοπίας αποκάλυψε τον προσυναπτικό εντοπισμό της [262]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν τη συμμετοχή της PKCε στη νευριτική ανάπτυξη και σε προσυναπτικές λειτουργίες, όπως η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.

Πράγματι, υπερέκφραση της PKCε έχει βρεθεί να ευοδώνει την εξαρτώμενη από το νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) νευριτική ανάπτυξη, ενώ η μείωση της έκφρασής της την αναστέλλει [263]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παρατηρούμενη προαγωγή της νευρικής ανάπτυξης από την PKCε είναι ανεξάρτητη από τη



δραστικότητα της καταλυτικής περιοχής της, καθώς έκφραση μόνο της ρυθμιστικής της περιοχής επάγει νευρικές αποφύσεις τουλάχιστον σε κύτταρα από νευροβλάστωμα [264].

Ο προσυναπτικός εντοπισμός της PKCε και η παρουσία της στις νευρικές απολήξεις συνάδει με το σημαντικό της ρόλο στη μακροχρόνια ενδυνάμωση της MF-CA3 οδού στον ιππόκαμπο, πιθανά αυξάνοντας την προσυναπτική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Σε γενικές γραμμές παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKC είναι αναγκαία για την ρύθμιση της νευρωνικής πλαστικότητας προσυναπτικά [262], αν και δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος ενεργοποίησής της προσυναπτικά κατά τη διάρκεια του LTP. Πιθανά αυτό συμβαίνει μέσω παραγωγής αραχιδονικού οξέος μετασυναπτικά, το οποίο στη συνέχεια διαχέεται, και όπως έχει δείχθει ενεργοποιεί επιλεκτικά την PKCε [265].

Η προσυναπτική παρουσία της PKCε είναι, επίσης, σημαντική για την ωρίμανση των συνάψεων. Οι Hama et al. [266] επέδειξαν ότι η επαφή των νευρώνων με αστροκύτταρα ενδυναμώνει το διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό και επάγει διεγερτικές συνάψεις, ενώ η συναπτογένεση διακόπτεται από αναστολές της PKC. Από όλες τις PKC ισομορφές που εντοπίστηκαν στους προσυναπτικούς νευρώνες, οι συγγραφείς αυτοί κατέληξαν ότι η PKCε συμμετέχει στη συναπτογένεση, καθώς παραγωγή αραχιδονικού οξέος από τη φωσφολιπάση A<sub>2</sub> είναι απαραίτητη για την PKCε ενεργοποίηση και τη συναπτογένεση. Τα παραπάνω υποδεικνύουν τη συμμετοχή της PKCε στην προσυναπτική τροποποίηση και ρύθμιση.

Η PKCε έχει, επίσης, συνδεθεί με απευθείας ευόδωση των γνωστικών λειτουργιών. Η ενεργοποίησή της έχει δείχθει να ενισχύει τη διαβίβαση χολινεργικών υποδοχέων, γνωστών για τις θετικές τους επιδράσεις στις γνωσιακές λειτουργίες ασθενών με Alzheimer's, και επιπλέον υπερέκφρασή της αυξάνει το σχηματισμό της διαλυτής APP πρωτεΐνης in vivo, προλαμβάνοντας τις παθολογικές αμυλοειδείς πλάκες σε διαγονιδιακά ποντίκια [267].

Από όλα όσα προαναφέρθηκαν διαφαίνεται ο σημαντικός ρόλος των PKC στη συναπτική πλαστικότητα και τις γνωσιακές λειτουργίες, ωστόσο, η ακριβής δράση των PKC ισομορφών στη μεταγωγή σήματος των κανναβινοειδών και ο μηχανισμός αλληλεπίδρασής τους με το CB1R σε νευρικά κύτταρα δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί.

### 1.7. ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΠΟΖΙΤΡΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗ

Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (συχνότερα ποζιτρονική τομογραφία, PET) είναι μια μη επεμβατική διαγνωστική τεχνική με βάση την οποία απεικονίζονται οι μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με τη λειτουργία των κυττάρων και των ιστών του ανθρώπινου σώματος σε μοριακό επίπεδο. Για το λόγο αυτό συχνά αναφέρεται και ως μοριακή απεικόνιση. Αποτελεί επανάσταση στην απεικόνιση γιατί - με τη βοήθεια ραδιοφαρμάκων - τη μετατοπίζει από την παραδοσιακή μελέτη της ανατομίας στη μελέτη του μεταβολισμού. Αυτό είναι σημαντικό γιατί α. σε φυσιολογικές καταστάσεις μπορούν να μελετηθούν μέσω εικόνων οι μεταβολικές οδοί και β. σε παθολογικές καταστάσεις μπορούν να εντοπιστούν προβλήματα σε πολύ αρχικό στάδιο, πριν ακόμα να έχει αλλοιωθεί η ανατομία. Η εξέταση σε ποζιτρονικό/αξονικό τομογράφο (PET/CT) συνδυάζει την αξονική τομογραφία με την ποζιτρονική τομογραφία, παρέχοντας εικόνες υψηλής ποιότητας που συνδυάζουν την ανατομική πληροφορία που παρέχει ο αξονικός τομογράφος (CT) με την πληροφορία για τη μεταβολική δραστηριότητα των μελετώμενων ιστών και οργάνων από τον ποζιτρονικό τομογράφο.

Η ποζιτρονική τομογραφία έχει μέχρι τώρα συμβάλλει σημαντικά στη μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας του εγκεφάλου. Είναι γνωστό ότι ο εγκέφαλος λειτουργεί κυρίως με κατανάλωση γλυκόζης. Η χορήγηση φθοριωμένης γλυκόζης (F18 FDG) επιτρέπει να μελετηθεί μέσω εικόνων η επίδραση στον εγκέφαλο διαφόρων ερεθισμάτων και η εντόπιση των κέντρων του εγκεφάλου που εμπλέκονται σε μία λειτουργία φυσιολογική ή παθολογική. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω αύξησης είτε μέσω ελάττωσης της πρόσληψης του ραδιοφαρμάκου που αντανakλά εμμέσως την αντίστοιχη αύξηση ή ελάττωση του μεταβολισμού των συγκεκριμένων περιοχών. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζει το F18 FDG σε σχέση με τη γλυκόζη είναι ότι, αφού εισέλθει στο κύτταρο και φωσφορυλιωθεί από την εξωκινάση, δε μεταβολίζεται περαιτέρω με συνέπεια να αυξάνεται σταδιακά μέσα στο κύτταρο. Αυτό το χαρακτηριστικό του F18 FDG, σε συνδυασμό με το χρόνο ημίσειας ζωής του ραδιοϊσοτόπου (110 λεπτά), το καθιστά κατάλληλο για απεικόνιση.

Με ποζιτρονική τομογραφία έχει μελετηθεί και η μνήμη σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις [268-273]. Συγκεκριμένα, η ποζιτρονική τομογραφία, μέσω διαφόρων πειραματικών προσεγγίσεων που αξιολογούν τη μνήμη, έχει τη δυνατότητα να απεικονίσει το αντίστοιχο μέρος του εγκεφάλου που εμπλέκεται στη συγκεκριμένη λειτουργία. Η μορφή αυτή μελέτης της λειτουργίας του εγκεφάλου



προσφέρει σημαντικά προτερήματα γιατί οδηγεί σε ακριβή επισήμανση των κέντρων του εγκεφάλου που εμπλέκονται.

Πληθώρα μελετών έχουν γίνει με PET σε ανθρώπους για τη μελέτη της μνήμης και έχουν δείξει επανειλημμένως ενεργοποίηση του μετωπιαίου φλοιού με τη χρήση ποικιλίας ερεθισμάτων. Μία από τις πρώτες μελέτες μνήμης με PET αποκάλυψε ότι δοκιμασίες λεκτικής λειτουργικής μνήμης, και συγκεκριμένα ανάκληση και απαρίθμηση ψηφίων που είτε επιλέχθηκαν κατά την εξέταση από τον εξεταζόμενο είτε απαγγέλθηκαν από τον εξεταστή, προκάλεσαν αμφίπλευρη ενεργοποίηση της μέσης οπισθοπλάγιας περιοχής του μετωπιαίου φλοιού [269]. Επίσης, έχει καταδειχθεί ότι με την επαναλαμβανόμενη παρουσίαση των ίδιων εικόνων σε φυσιολογικούς ανθρώπους στους οποίους ζητήθηκε στη συνέχεια να θυμηθούν τη σειρά των εικόνων, δημιουργήθηκε ενεργοποίηση στον πρόσθιο ενδιάμεσο μετωπιαίο φλοιό [274]. Σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι λανθασμένη αναγνώριση ερεθισμάτων δημιούργησε αυξημένη αιμάτωση στο μετωπιαίο φλοιό και στον εμπρόσθιο δεξιό προμετωπιαίο φλοιό αμφοτερόπλευρα, σε σύγκριση με τη σωστή αναγνώριση [275].

Τα προβλήματα μνήμης που οφείλονται σε δυσλειτουργία του μετωπιαίου φλοιού συνήθως είναι μικρού βαθμού και πολλές φορές επισκιάζονται από τη χρήση πιο κεντρικών μερών του εγκεφάλου. Συνεπώς, μία απεικονιστική μέθοδος όπως το PET προσφέρει σε τέτοιες περιπτώσεις τη δυνατότητα να εντοπιστεί ακριβώς το κέντρο δυσλειτουργίας όταν οι λοιπές κλινικές αξιολογήσεις υστερούν. Επίσης, με το PET μπορούμε να μελετήσουμε ξεχωριστά κάθε επιμέρους διαδικασία μνήμης. Για παράδειγμα, συγκεκριμένες δοκιμασίες μνήμης έχουν βρεθεί να ενεργοποιούν τον ιππόκαμπο [268,270,272,276,277]. Σε συμφωνία με άλλες μελέτες που αποκάλυψαν αυξημένο μεταβολισμό γλυκόζης και αυξημένη αιμάτωση στον ιππόκαμπο πρωτευόντων θηλαστικών κατά τη διάρκεια δοκιμασιών χωρικής μνήμης [277,272, αντίστοιχα], τα ευρήματα PET των Curtis et al. [270] έδειξαν εξαιρετικά σημαντική ενεργοποίηση του δεξιού πρόσθιου ιππόκαμπου κατά την τέλεση δοκιμασιών χωρικής μνήμης και αναγνώρισης αντικειμένων. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν περαιτέρω το σημαντικό ρόλο του ιππόκαμπου στις διαδικασίες κωδικοποίησης και ανάκλησης της λειτουργικής μνήμης. Τέλος, με το PET μπορούν να μελετηθούν τα εγκεφαλικά νευρωνικά κυκλώματα που εμπλέκονται σε μία συγκεκριμένη διαδικασία μνήμης [278].



Η ποζιτρονική τομογραφία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε ζώα εργαστηρίου, μεταξύ των οποίων και οι αρουραίοι, κυρίως για την ανίχνευση όγκων [279]. Για τη μελέτη, όμως, της λειτουργίας του εγκεφάλου μικρών ζώων η απεικόνιση συνήθως απαιτεί - κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους των υπό εξέταση ζώων - μεγάλη διακριτική ικανότητα που επιτυγχάνεται με Small Animal PET (ή micro PET). Στις περιπτώσεις αυτές είναι δυνατό να ανιχνευθούν αλλαγές της μεταβολικής δραστηριότητας ακόμη και σε μικρές περιοχές του εγκεφάλου των τρωκτικών, όπως ο ιππόκαμπος [280-282], για οποίες εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία ένας συμβατικός ποζιτρονικός τομογράφος.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι CB1 υποδοχείς (CB1Rs) των κανναβινοειδών παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική ανάπτυξη και τη συναπτική δραστηριότητα, αλλά και σε λειτουργίες του ΚΝΣ, όπως η μάθηση και η μνήμη. Η διερεύνηση των οδών μεταγωγής σήματος που επάγονται από την ενεργοποίηση του CB1R και εμπλέκονται στις γνωσιακές επιδράσεις της χρήσης κάνναβης, έχει βρεθεί στο επίκεντρο εκτεταμένων ερευνητικών προσπαθειών. Θεωρώντας την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) ως σημαντικό συντελεστή στη νευρωνική διαφοροποίηση και τη διαμόρφωση της μνήμης, εξετάσαμε το ρόλο της PKCε ισομορφής στα προκαλούμενα από κανναβινοειδή μνημονικά ελλείμματα χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής σε οργανισμικό επίπεδο, καθώς και σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Ένας πρώτος στόχος της μελέτης αυτής ήταν ο χαρακτηρισμός της ποζιτρονικής τομογραφίας (PET) ως κατάλληλο ή όχι μοριακό εργαλείο για τη σκιαγράφηση σε πραγματικό χρόνο της δράσης και της έκφρασης της PKCε στις εγκεφαλικές περιοχές που ασκούν τον έλεγχο της λειτουργικής μνήμης. Συγκεκριμένα, οι προσπάθειες σε αυτό το στόχο εστιάστηκαν στη χαρτογράφηση των περιοχών του εγκεφάλου επιμύων που αναπτύσσουν δευρογενείς αλλαγές στο μεταβολισμό μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων των κανναβινοειδών, και στη μελέτη της εξάρτησης αυτών των μεταβολών από τη δραστηριότητα της PKCε.

Επόμενη και βασική επιδίωξη της διατριβής ήταν η μελέτη σε νευρωνικό κυτταρικό περιβάλλον του ρόλου και της δράσης της PKCε ισομορφής στην επαγόμενη από κανναβινοειδή ρύθμιση των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών ERK1/2, κριτικής σημασίας σηματοδοτικά ενδιάμεσα που ρυθμίζουν λειτουργίες όπως νευρωνική διαφοροποίηση, πλαστικότητα και μνήμη. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό των εγγύς σηματοδοτικών γεγονότων και αλληλεπιδράσεων που συνδέουν την ενεργοποίηση του CB1R με την ενεργοποίηση της ERK στο ΚΝΣ, και ειδικότερα σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων, αλλά και σε κυτταρικές σειρές, μετά από ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων με ανάλογα ενδοκανναβινοειδών.

Η διεξοδική ανάλυση των πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην ενεργοποίηση της ERK από τον CB1R σε νευρικό περιβάλλον και η σύνδεσή τους με νευρωνική διαφοροποίηση, είναι θεμελιώδους σημασίας για την παραγωγή νέας γνώσης που ευελπιστούμε να δώσει μια σαφέστερη αντίληψη των ελάχιστα κατανοητών μέχρι σήμερα οξείων επιδράσεων της κάνναβης.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PET/CT

#### 2.1.1. Πειραματόζωα

Για τη χαρτογράφηση της λειτουργικής μνήμης με ποζιτρονική τομογραφία μετά τη χορήγηση κανναβινοειδών, χρησιμοποιήθηκαν άρρενες λευκοί επίμυες του γένους Wistar από τη Μονάδα Ζωϊκών Προτύπων του ΙΙΒΕΑΑ. Το βάρος των ζώων κατά την πειραματική διαδικασία ήταν 300-350 γρ. Οι συνθήκες διαβίωσης ήταν σταθερές και ίδιες για όλα τα ζώα που βρίσκονταν τοποθετημένα σε ίδια κλουβιά ανά τρία, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή (ζωοτροφή) και νερό. Τα πειραματόζωα δεν είχαν τραφεί για 4 ώρες προ της εξέτασης.

#### 2.1.2. Χορήγηση αγωνιστών και ανταγωνιστών των κανναβινοειδών

Για την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα χορηγήθηκε στα ζώα το συνθετικό και μεταβολικά σταθερό ανάλογο της ενδογενούς ανανδαμίδης, μεθανανδαμίδα (R(+)-Methanandamide ή R(+)-MA; (R)-N-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatet raenamide) (Tocris). Ως επιλεκτικός και δραστικός ανταγωνιστής του CB1 υποδοχέα επιλέχθηκε ο AM251 (N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide) (Tocris).

Στα ζώα χορηγήθηκαν οι εξής συνδυασμοί διαλυμάτων:

- I. Μάρτυρας
- II. Μάρτυρας + Μεθανανδαμίδα (R(+)-MA)
- III. Μάρτυρας + AM251
- IV. AM251+Μεθανανδαμίδα (R(+)-MA)

Τα διαλύματα R(+)-MA (2.5 mg/kg) [96] και AM251 (1 mg/kg) [96b] και ο συνδυασμός των δύο, ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε όγκο 0.1 ml ανά 10 γρ. σωματικού βάρους, είτε 15 λεπτά πριν απο την πρώτη δοκιμή T1 (sample trial) της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένων είτε αμέσως μετά την T1. Ταυτόχρονα στην ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε ο μάρτυρας (NaCl 0,9%).



### 2.1.3. Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων (Object recognition task)

Η πειραματική αυτή διάταξη αξιολογεί τις δυνατότητες της λειτουργικής και της βραχυπρόθεσμης μνήμης στα πειραματόζωα. Βασίζεται στην αυθόρμητη επιμονή εξερεύνησης χώρων και αντικειμένων που είναι χαρακτηριστικό των πειραματοζώων [283].

Η δοκιμασία αυτή εκτελέσθηκε σύμφωνα με τους Pitsikas et al. [284]. Η πειραματική συσκευή αποτελούνταν από έναν πλαστικό χώρο διαστάσεων 80 εκ. 60 εκ. 50 εκ. Τα αντικείμενα (σε 3 αντίγραφα το καθένα) που έπρεπε να αναγνωρισθούν ήταν κατασκευασμένα από διαφορετικά υλικά (γυαλί, πλαστικό, ή μέταλλο) και είχαν διαφορετικά σχήματα: κύβοι, πυραμίδες, κύλινδροι.

Η δοκιμασία έλαβε χώρα σε δύο περιόδους. Την πρώτη ημέρα οι επίμυες τοποθετήθηκαν στην πειραματική συσκευή για να εξοικειωθούν με το χώρο. Σε αυτή τη φάση δεν υπήρχαν αντικείμενα μέσα στην πειραματική συσκευή. Η δοκιμασία μνήμης εκτελέσθηκε τη δεύτερη μέρα με δύο δοκιμές διάρκειας 2 λεπτών έκαστη. Κατά τη διάρκεια της πρώτης δοκιμής, T1 (sample trial) δύο ίδια αντικείμενα τοποθετήθηκαν σε 2 αντίθετες γωνίες του πειραματικού χώρου. Ο επίμυς τοποθετήθηκε στο κέντρο της συσκευής και του επιτράπηκε να εξερευνήσει τα δύο αντικείμενα για όλη τη χρονική διάρκεια της δοκιμής. Μετά την ολοκλήρωση της T1 το πειραματόζωο επέστρεψε στο κλουβί του και ένα διάλειμμα (intertrial interval) διάρκειας 60 λεπτών δόθηκε. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δοκιμή, T2 (choice trial). Αυτή τη φορά ένα νέο αντικείμενο (N) αντικατέστησε ένα από τα δύο ίδια αντικείμενα της πρώτης δοκιμής. Συνεπώς, οι επίμυες κλήθηκαν να εξερευνήσουν δύο διαφορετικά αντικείμενα σ' αυτή τη δοκιμή, το ήδη γνωστό αντικείμενο (P) και το νέο (N). Αν ο επίμυς κατά τη T2 εξερευνήσει για περισσότερο χρόνο το νέο από το ήδη γνωστό αντικείμενο αυτό αποτελεί ένδειξη καλής μνήμης.

Η δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων προηγήθηκε της εξέτασης PET προκειμένου τα πειραματόζωα να ασκήσουν τη βραχυπρόθεσμη μνήμη τους και να επιτύχουμε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα αναφορικά με την ένταση της ενεργοποίησης των περιοχών (ιππόκαμπος, μετωπιαίος φλοιός) που συνδέονται με τη λειτουργική μνήμη.

#### 2.1.4. Λήψη εικόνων PET/CT

Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν αρχικά σε μία εξέταση PET/CT σε ηρεμία (εξέταση 1). Σε δεύτερο χρόνο, αφού κατανεμήθηκαν σε ομάδες και τους χορηγήθηκαν τα διαλύματα ενδοπεριτοναϊκά, όπως αναφέρεται παραπάνω στη «Χορήγηση αγωνιστών και ανταγωνιστών των κανναβινοειδών», υποβλήθηκαν στην δοκιμασία μνήμης, και αμέσως μετά σε ποζιτρονική τομογραφία (εξέταση 2). Και στις 2 εξετάσεις τα πειραματόζωα δεν είχαν τραφεί για 4 ώρες προ της εξέτασης.

Στην πρώτη εξέταση, 200  $\mu\text{Ci}$  F-18 FDG χορηγήθηκαν σε ηρεμία ενδοφλέβια μέσω της πλάγιας ουριαίας φλέβας και αφού προηγουμένως το ζώο είχε τοποθετηθεί σε ειδική συσκευή συγκράτησης. Το πειραματόζωο κρατήθηκε σε ηρεμία για 30 λεπτά και αφού πρώτα δεχθηκε αναισθησία ενδοπεριτοναϊκά με ένεση πεντοβαρβιτάλης (60mg/kg). Αμέσως μετά υποβλήθηκε σε εξέταση PET/CT. Στην εξέταση 2 χορηγήθηκαν 15-30 δευτερόλεπτα μετά τη δοκιμασία μνήμης 200  $\mu\text{Ci}$  από F-18 FDG και, στη συνέχεια, η διαδικασία έγινε όπως στην εξέταση 1.

Η ποζιτρονική τομογραφία πραγματοποιήθηκε σε 3D Mode με το Biograph 6.0 (Siemens Medical Solutions) PET/CT στο Κέντρου Πυρηνικής Ιατρικής του ΙΙΒΕΑΑ υπό τη διεύθυνση της Δρ. Σ. Χατζηγιάννου και με τη σημαντική τεχνική βοήθεια του Λ. Παπασπύρου. Η αξονική τομογραφία πραγματοποιήθηκε σε αξονικό τομογράφο 6 τομών και η ποζιτρονική τομογραφία σε “full-ring” ποζιτρονικό τομογράφο με κρύσταλλο LSO. Το πειραματόζωο τοποθετήθηκε μπρούμυτα (**Εικ.7**). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αξονική τομογραφία μέσα σε περίπου 10 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά η ποζιτρονική τομογραφία χωρίς μετακίνηση του πειραματόζωου μεταξύ των δύο εξετάσεων. Η ποζιτρονική τομογραφία έγινε για 30 λεπτά σε “one bed position”. Οι εικόνες διορθώθηκαν για εξασθένηση ακτινοβολίας (attenuation correction) βάσει των δεδομένων της αξονικής τομογραφίας. Στη συνέχεια, διορθώθηκαν για σκέδαση και επεξεργάστηκαν με “iterative reconstruction”.



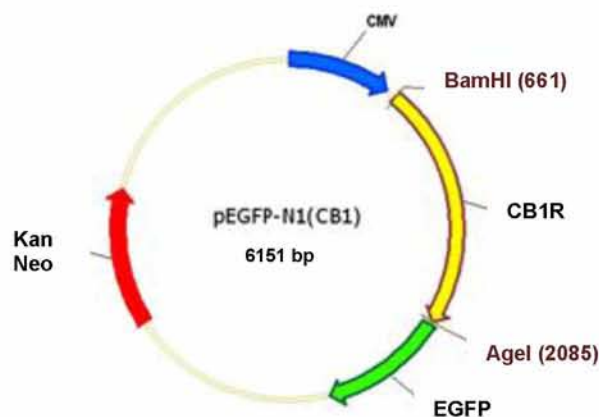
**Εικόνα 7.** Η τοποθέτηση του επίμου στο PET λίγο πριν υποβληθεί σε ποζιτρονική τομογραφία



## 2.2. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### 2.2.1. Πλασμίδια

Το πλασμίδιο του pEGFP-N1-CB1R με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (**Εικ. 8**) παραχωρήθηκε από τον Dr. Zsolt Lenkei [285], ενώ τα πλασμίδια pHACE-PKCε-WT και pHACE-PKCε-CAT που εκφράζουν ολόκληρο το γονίδιο της PKCε και μόνο την καταλυτική περιοχή της PKCε, αντίστοιχα, ήταν προσφορά του Dr. Jae-Won Soh [286].



**Εικόνα 8.** Το πλασμίδιο του CB1R-EGFP

### 2.2.2. Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών στη εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA είναι τα κυτταρικά στελέχη του *Escherichia Coli* (*E. Coli*) DH5a. Για την καλλιέργειά τους σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε το υλικό LB Agar (Sigma), ενώ για την υγρή καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υλικό καλλιέργειας Luria Broth (LB) (Sigma). Το LB Agar διαλύεται κατά την υγρή αποστείρωση και προτού κρυώσει και πολυμεριστεί προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη) ανάλογα με το πλασμίδιο και το βακτηριακό στέλεχος που καλλιεργείται. Τα βακτηριακά DH5a κύτταρα από stock γλυκερόλης επιστρώνονται σε τρυβλίο LB Agar απουσία αντιβιοτικού και καλλιεργούνται στους 37°C για 16 ώρες. Από το παραπάνω τρυβλίο επιλέγεται μία αποικία, η οποία ενοφθαλμίζεται σε 5 ml LB Broth, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού, και καλλιεργείται στους 37°C για 16 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση. Από τη μικρή καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml, το οποίο μεταφέρεται σε καλλιέργεια LB Broth των 50-100 ml, παρουσία αντιβιοτικού. Ακολουθεί η ανάπτυξη των κυττάρων στους



37°C, υπό ανάδευση, μέχρι η οπτική πυκνότητα OD<sub>550</sub> να φτάσει τιμές 0.5-1.0. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 3000 rpm, για 20 λεπτά στους 0°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml παγωμένου διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 0.1M, και παραμένει στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3000 rpm, για 15 λεπτά στους 0°C, και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 3.3 ml (1/15 του όγκου) παγωμένου διαλύματος 0.1M CaCl<sub>2</sub>-15% γλυκερόλης. Το διάλυμα των κυττάρων παραμένει στον πάγο για 4-20 ώρες κι έπειτα διαμοιράζεται ανά 100 μl σε erpendorfs (aliquots) και φυλάσσεται στους -80°C. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα αποστειρωμένα και η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες.

### 2.2.3. Μετασχηματισμός καλλιιεργειών E.Coli

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 100 μl επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων (aliquot από τους -80°C). Στο aliquot προστίθενται περίπου 100 ng πλασμιδιακού DNA. Ύστερα από 30 λεπτά επώασης στον πάγο, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C, που διαρκεί 90 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επιστρέφουν στον πάγο για επώαση 2 λεπτών. Έπειτα, προστίθεται στο aliquot LB Broth μέσο (900 ml), επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα και επιστρώνεται σε τρυβλίο. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, όπου παραμένει για 16 ώρες στους 37°C.

### 2.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων

#### Μικρής κλίμακας απομόνωση DNA- Μέθοδος βρασμού (Boiling prep)

Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία, μπορεί να εκτελεστεί με πολλά δείγματα ταυτόχρονα και οδηγεί σε υψηλή απόδοση πλασμιδίου.

- Μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίων E.coli μεταφέρεται σε 3 ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη). Τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C κάτω από συνθήκες έντονης ανάδευσης (180 rpm) για μια νύχτα (12-16 ώρες).
- Την επόμενη μέρα τα κύτταρα (1,5 ml) μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου Erpendorf και συλλέγονται με φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στις 5000 rpm για 15 λεπτά. Η υπόλοιπη καλλιέργεια μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για τουλάχιστον μία εβδομάδα.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος STET (8% σουκρόζη, 0,5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA).
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση μετά από προσθήκη 10 μl διαλύματος λυσοζύμης αρχικής συγκέντρωσης 10 mg/ml σε διάλυμα Tris-HCl pH 8.0.
- Κατόπιν ο σωλήνας τύπου Eppendorf τοποθετείται για 1 λεπτό σε νερό που βράζει.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται για 6 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και στο υπερκείμενο, το οποίο μεταφέρεται σε φρέσκο μικροσωληνίσκο, προστίθενται 500 μl απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA.
- Μετά από ανάδευση του μίγματος, το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά στους -80°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13000 g για 15 λεπτά και το ίζημα ξηραίνεται και διαλύεται σε 50 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH8.0) ή σε απεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

#### Μεσαίως κλίμακας απομόνωση DNA- Midi prep

Η μέθοδος της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με στήλη ανιονικής ρητίνης (NucleoBond Plasmid DNA Purification Kit, MACHEREY-NAGEL) βασίζεται στην εφαρμογή μιας τροποποιημένης διαδικασίας αλκαλικής/SDS λύσης (Birnboim και Doly, 1979) προκειμένου να ετοιμαστεί το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων για τον καθαρισμό του πλασμιδίου. Η απόδοση του συστήματος αντιστοιχεί σε 500 μg- 2 mg ξεκινώντας την απομόνωση από βακτηριακή καλλιέργεια 100-500 ml. Κάτω από τις συγκεκριμένες αλκαλικές συνθήκες τόσο το χρωμοσωμικό όσο και το πλασμιδιακό DNA μετουσιώνονται. Κατόπιν, οξικό κάλιο προστίθεται στο μετουσιωμένο εκχύλισμα προκαλώντας το σχηματισμό ενός ιζήματος που περιέχει το χρωμοσωμικό DNA και άλλα κυτταρικά συστατικά. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει στο διάλυμα όπου μπορεί να επανακτήσει τη φυσική υπερελικωμένη του δομή. Μετά την εξισορρόπηση της στήλης (NucleoBond column) με διάλυμα εξισορρόπησης, το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται στη ρητίνη ανιονικής ανταλλαγής (NucleoBond filter column) και τέλος εκλύεται μετά από αποτελεσματικό πλύσιμο της στήλης. Το πλασμιδιακό DNA που εκλύεται από τη στήλη κατακρημνίζεται με προσθήκη ισοπροπανόλης και γλυκογόνου σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διαλύεται σε διάλυμα TE.

Αναλυτικότερα,

- Η υγρή καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού και η οποία στο μεσοδιάστημα της απομόνωσης DNA μικρής



κλίμακας έχει διατηρηθεί σε θερμοκρασία 4°C, αραιώνεται σε συγκέντρωση 1:1000 σε κωνική φιάλη που περιέχει 100-200 ml LB (ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου).

- Η καλλιέργεια επωάζεται για μια νύχτα (12-16 ώρες) στους 37°C με έντονη συνεχή ανάδευση (300 rpm).
- Τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4500-6000 g για τουλάχιστον 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 4 ml διαλύματος S1 για κυτταρική λύση (Buffer S1: 50 mM Tris-HCL, 100 mM EDTA, 100 kg/ml RNase A, pH 8.0).
- Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml διαλύματος S2 (Buffer S2: 200 mM NaOH, 1% SDS) και το εναιώρημα ανακατεύεται ήπια. Το στάδιο της ανάδευσης πρέπει να γίνεται με προσοχή ώστε να μην απελευθερωθεί χρωμοσωμικό DNA και μολύνει το πλασμιδιακό DNA.
- Ακολουθεί επώαση του μίγματος για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 4 ml διαλύματος S3 (Buffer S3: 2,8 M KAc, pH 5.1), ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά στους 4°C.
- Στο μεταξύ, η κολώνα (Nucleobond column) σταθεροποιείται κάθετα και το pH της ρυθμίζεται με την προσθήκη 2,5 ml διαλύματος N2 (Buffer N2: 100 mM Tris, 15% ethanol, 900 mM KCL, 0,15% Triton X-100, pH 6.3), αφήνοντας το έκλουσμα να απορριφθεί.
- Αφού το μίγμα φυγοκεντρηθεί για 10 λεπτά στις 6000 rpm στους 4°C, το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης περνάει μέσα από τη στήλη ώστε να δεσμευτεί το πλασμιδιακό DNA στο φίλτρο της κολώνας και απορρίπτεται το flow-through.
- Ακολουθούν δύο εκπλύσεις της κολώνας με 10 ml διαλύματος N3 (Buffer N3: 100 mM Tris, 15% ethanol, 1,15 M KCL, pH 6.3).
- Το πλασμιδιακό DNA απομονώνεται χρησιμοποιώντας 5 ml διαλύματος N5 (Buffer N5: 100 mM Tris, 15% ethanol, 1 M KCL, pH 8.5) και συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon.
- Προστίθενται 3,5 ml ισοπροπανόλη και γλυκογόνο σε συγκέντρωση 1:2000 ώστε να κατακρημνιστεί το DNA και ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μίγματος για 2 λεπτά.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 g για 15 min στους 4°C και απορρίπτεται προσεκτικά το υπερκείμενο.
- Προστίθενται 2 ml 70% αιθανόλη για καθαρισμό του ιζήματος και φυγοκεντρείται ξανά σε 15000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



- Όλη η ποσότητα αιθανόλης αφαιρείται προσεκτικά από το σωληνίσκο και το ίζημα στεγνώνει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε TE ή απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και
- Υπολογίζεται η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα 260 nm.

#### 2.2.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με βάση την οπτική πυκνότητα του διαλύματος, όπως αυτή υπολογίζεται από το UV/Vis φασματοφωτόμετρο. Οι μετρήσεις του DNA πραγματοποιούνται σε κυψελίδες χαλαζία, το δείγμα αραιώνεται με dH<sub>2</sub>O και μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm και στα 280 nm. Η τιμή της απορρόφησης OD<sub>260</sub> επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA, ενώ ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> αποτελεί δείκτη της καθαρότητας του DNA.

#### 2.2.6. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για τον έλεγχο του μεγέθους κομματιών DNA, οποιοδήποτε κομμάτι του DNA μπορεί να κοπεί σε μικρότερα με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες και παράγονται από βακτήρια. Αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους τεσσάρων ως οχτώ νουκλεοτιδίων, και κόβουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης ή σε γειτονικό της σημείο. Ονομάζονται περιοριστικές γιατί η δραστηρότητά τους περιορίζεται σε ξένο DNA.

Για την πέψη DNA μορίων με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά διαλύματα που συνοδεύουν κάθε ένζυμο. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1μg DNA με 1 unit ενζύμου στα 20μl συνολικού όγκου αντίδρασης. Στην περίπτωση του CB1R χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα BamHI και AgeI. Ακολουθεί επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο 37°C για δύο ώρες και ανάλυση δείγματος από το διάλυμα της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης μετά από προσθήκη χρωστικής.

#### 2.2.7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Μόρια DNA μήκους 0.1 - 20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0,8-2% οριζόντιες πηκτές αгарόζης. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε

αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν.

#### A) Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως σε συγκέντρωση 2%) διαλύεται πλήρως σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE (Tris 2 M, AcCOOH 905 mM, Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O EDTA 100 mM) με θέρμανση στους 100°C για 3 λεπτά περίπου. Προστίθεται 0,5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη συσκευή όπου αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

#### B) Ηλεκτροφόρηση

Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Τα δείγματα DNA φορτώνονται στην οριζόντια πηκτή αγαρόζης και ηλεκτροφορούνται μετά από την προσθήκη ειδικού διαλύματος χρωστικής (loading buffer 6x 0.25% κ.β. μπλε της βρωμοφαινόλης και 40% κ.β. σακχαρόζης σε H<sub>2</sub>O) σε σταθερής έντασης ρεύμα 90 mA. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα αναλύεται κατάλληλος μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (Dolphin-Doc Pro system, Wealtec) όπου διακρίνονται φθορίζουσες ζώνες στις θέσεις όπου βρίσκονται τα μόρια DNA.

### 2.3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Κατά την έναρξη και τη διατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών απαιτούνται απολύτως στείρες συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκτέλεση όλων των εργασιών σε θάλαμο με συνεχή νηματική ροή και φιλτράρισμα του αέρα. Η αποστείρωση του χώρου κυτταροκαλλιέργειας επιτυγχάνεται με υπεριώδη ακτινοβολία για 15 λεπτά περίπου, ενώ για τοπική αποστείρωση του χώρου χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης 70%. Η αποστείρωση των υλικών πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο στους 120°C και πίεση 1 kp/cm<sup>2</sup> για 1,5 ώρα περίπου. Υγρά υλικά που καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες αποστειρώνονται μόνο μετά από στείρα διήθηση μέσα από φίλτρα 0,22 µm.

#### 2.3.1. Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Νευρώνων

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων,



προερχόμενες από τον τελεγκέφαλο νεοσσού όρνιθας, ως μοντέλο νευρωνικής διαφοροποίησης. Η απομόνωση και διατήρηση *πρωτογενών καλλιιεργειών φλοιϊκών νευρώνων εμβρύου όρνιθας* έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται από τις ομάδες της Mangoura [206] και Cheng et al. [287]. Έμβρυα όρνιθας 7<sup>ης</sup> εμβρυϊκής μέρας θυσιάστηκαν και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια αφαιρέθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες. Ακολούθησε αφαίρεση των μηνίγγων και έκπλυση με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffer Saline, PBS) για τη απομάκρυνση των αιμοσφαιρίων. Εν συνεχεία, τα ημισφαίρια διαχωρίστηκαν μηχανικά μετά από διέλευση μέσα από ειδική μεμβράνη (mesh) με πόρους διαμέτρου 48  $\mu\text{m}$ . Ακολούθησε η επίστρωσή τους σε τρυβλία που είχαν επωαστεί για τουλάχιστον 4-5 ώρες με πολυλυσίνη (poly-L-lysine, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) ως υπόστρωμα προσκόλλησης, ακολουθούμενη με εκπλύσεις με PBS και ddH<sub>2</sub>O, και στα οποία στη συνέχεια είχε προστεθεί θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5 g/L και 20% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Η προσθήκη του ορού σε μεγάλη συγκέντρωση για τουλάχιστον τρεις ώρες κρίνεται απαραίτητη για την προσκόλληση θρεπτικών στοιχείων (αυξητικών παραγόντων κ.α.) πάνω στην ήδη προσκολλημένη πολυλυσίνη του υποστρώματος. Οι νευρώνες καλλιιεργήθηκαν σε DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5 g/L και τελική συγκέντρωση ορού εμβρύου βοός 1-5% (v/v). Οι επωάσεις και τα υπόλοιπα πειράματα με νευρώνες πραγματοποιήθηκαν μετά 3 ή 4 ημέρες σε καλλιέργεια (culture day 3 (C3) or 4 (C4)).

### 2.3.2. Καλλιέργεια Ευκαριωτικών Κυττάρων

Η *SH-SY5Y κυτταρική σειρά* χρησιμοποιήθηκε σε αρκετά από τα πειράματά μας, καθώς αποτελεί παγκόσμια αποδεκτό μοντέλο μελέτης νευρωνικής λειτουργίας με ενδεδειγμένο χαρακτηρισμό. Πρόκειται για έναν από τους τρεις διαδοχικά απομονωμένους κλώνους της κυτταρικής σειράς *ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH*, η οποία δημιουργήθηκε το 1970 από βιοψία μεταστατικού νευροβλαστώματος στο μυελό των οστών [318]. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε μίξη θρεπτικού υλικού DMEM (45%) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και F12 (Ham, Nutrient mixture με L-γλουταμίνη) (45%), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός.

Τα κύτταρα *νευροβλαστώματος ποντικού N2a*, τα *ανθρώπινα νεφρικά εμβρυϊκά κύτταρα HEK293*, οι *ινοβλάστες των νεφρών* πίθηκου COS7 και τα *C6 γλοιωματικά κύτταρα*, καλλιιεργήθηκαν όλα σε DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L



εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός. Για το *ινοβλάστωμα ανθρώπου IMR32* χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο MEM alpha (45%) και F12 (45%) με προσθήκη 10% ορού εμβρύου βοός, ενώ για τα *PC12 κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος αρουραίου* το θρεπτικό μέσο αποτελούνταν από RPMI-1640 με 10% ορό αλόγου και 5% ορό εμβρύου βοός. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα PC12 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία είχαν πριν υποστεί επεξεργασία με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Το κολλαγόνο φτιάχτηκε από ουρές ποντικού σε οξικό οξύ και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:50 (1 ml κολλαγόνο, 13 ml αιθανόλη και 36ml H<sub>2</sub>O).

Όλα τα θρεπτικά μέσα και υλικά προήλθαν από την εταιρεία Gibco, Life Technologies Inc, πλην των ορών βοός και αλόγου που προέρχονται από τη Biowest, και σε αυτά προστέθηκε 100 µg/mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG).

Τα κύτταρα συντηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο των 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Αλλαγή του θρεπτικού υλικού πραγματοποιούνταν κάθε δύο μέρες έως ότου τα κύτταρα καλύψουν όλη την επιφάνεια των τρυβλίων, με εξαίρεση τις πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων. Για τη διατήρηση των κυττάρων σε εκθετική φάση ανάπτυξης, οι καλλιέργειες αραιώνονταν και αναδιανέμονταν με τη χρήση τρυψίνης/EDTA όταν κάλυπταν το 80% της επιφάνειας των τρυβλίων. Η διαδικασία της αναδιανομής (cell passage) είχε ως εξής: τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBS πριν την προσθήκη τρυψίνης/EDTA για ~5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθετο ίσος όγκος θρεπτικού μέσου για την εξουδετέρωση της τρυψίνης και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε falcon 15mL ώστε να φυγοκεντρηθούν στις 1000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε θρεπτικό μέσο προκειμένου να πραγματοποιηθεί αναδιανομή του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε καινούρια τρυβλία.

### 2.3.3. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Τα κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν παροδικά με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα O 003 της τεχνολογίας Amaxa (Biosystems), το οποίο και επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Τα HEK293 συν-διαμολύνθηκαν με τα pHACE-PKCε-WT ή pHACE-PKCε-DN (3 µg/35 mm culture dish) και pCB1R-EGFP-N1 πλασμίδια (3 µg/35 mm culture dish) ή με 3 µg πλασμιδίου μάρτυρα, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα κύτταρα ενός 100 mm τρυβλίου με αποικίες που είχαν φτάσει σε κατάσταση

συμβολής, μετά από έκπλυση με PBS, επωάστηκαν με τρυψίνη/EDTA για ~5 λεπτά στους 37°C. Μετά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 100μl PBS για κάθε συνθήκη και κατόπιν αναμείχθηκε με το αντίστοιχο πλασμιδιακό DNA. Τα εκάστοτε εναιωρήματα που προέκυψαν (>100 μl το καθένα) τοποθετήθηκαν σε κυββέτες ηλεκτροδιάτρησης και ακολούθησε η ηλεκτροδιάτρηση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 35 mm και επωάστηκαν στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα συλλέχθηκαν για ανάλυση μετά 48 ώρες μετά από τη διαμόλυνση. Η απόδοση της διαδικασίας διαμόλυνσης των κυττάρων-στόχων (τυπικά ~70%) εκτιμήθηκε με GFP ανοσοφθορισμό και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting) με αντίστοιχα αντισώματα.

#### **2.3.4. Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων SH-SY5Y-CB1R**

Τα κύτταρα SH-SY5Y αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο των 100 mm μέχρι να καλύψουν την επιφάνειά τους κατά 80-90%, οπότε και ακολούθησε η διαμόλυνσή τους με 5 μg πλασμιδιακού DNA pCB1R-EGFP-N1 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης με Amaxa χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα A 023. Μετά την πάροδο 48 ωρών από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό που περιείχε το αντιβιοτικό geneticin (G418) που προσφέρει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη, σε συγκέντρωση 1 mg/ml, για την επιλογή των σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που έχουν ενθέσει το cDNA στο γονιδίωμά τους. Το θρεπτικό υλικό αλλάχθηκε με νέο που περιείχε G418 την τέταρτη και όγδοη ημέρα, ενώ γύρω στην εικοστή ημέρα είχαν εμφανιστεί μεμονωμένες αποικίες, οι οποίες ελήφθησαν με αποστειρωμένους κυλίνδρους και αναπτύχθηκαν σε ξεχωριστά πηγαδάκια πλακών 24 πηγαδιών παρουσία 500 μg/ml G418. Όταν αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να καλύψουν την επιφάνεια των πηγαδιών κατά 80% αναδιανεμήθηκαν σε μεγαλύτερα τρυβλία παρουσία 500 μg/ml G418.

#### **2.3.5. Χορήγηση αγωνιστών, ανταγωνιστών και αναστολέων**

Ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (κεφάλαιο 2.1.2) έγινε με τη χορήγηση του συνθετικού και μεταβολικά σταθερού αναλόγου της ενδογενούς ανανδαμίδης, μεθανανδαμίδη ή R(+)-MA (Tocris). Η μεθανανδαμίδη (στο εξής R(+)-MA) είναι ένας πολύ ειδικός αγωνιστής των CB1 υποδοχέων, με Ki=20 nM για τους CB1 υποδοχείς και Ki=815 nM για τους CB2 υποδοχείς (41 φορές πιο



ειδικός αγωνιστής για τους CB1R έναντι των CB2R) [39]. Η R(+)-MA, προκειμένου να χορηγηθεί σε κύτταρα, διαλύθηκε αρχικά σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{M}$  σε απόλυτη αιθανόλη και χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 20 nM (εκτός και αν υπάρχει διαφορετική επισήμανση) με επιπλέον αραίωση που γινόταν την ημέρα του πειράματος. Ως επιλεκτικός και δραστικός ανταγωνιστής του CB1 υποδοχέα επιλέχθηκε ο AM251 (Tocris) [288] που εμφανίζει 306 φορές μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για το CB1 υποδοχέα έναντι του CB2. Η διάλυσή του έγινε σε DMSO σε συγκέντρωση 5 mM, ενώ στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$  με απευθείας διάλυση μέσα στο θρεπτικό μέσο. Οι αναστολείς της PLC U73122 (3  $\mu\text{M}$ ), των PKC R531-8220 (1  $\mu\text{M}$ ) και Gö6976 (3  $\mu\text{M}$ ), και της τοξίνης του κοκκίτη (PTX, 200 ng/ml) ήταν προϊόντα της Calbiochem, οι αναστολείς της οικογένειας των Src κινασών PP1 (10  $\mu\text{M}$ ) και PP2 (20  $\mu\text{M}$ ) της Alexis, ο αναστολέας του FGFR PD173074 (50 nM) και ο διαταράκτης των λιπιδικών σχεδίων M $\beta$ CD (methyl-beta-cyclodextrin, 5 mM) ήταν προϊόντα της Sigma, ενώ ο αναστολέας της MEK U0126 (10  $\mu\text{M}$ ), ο EGF (100 nM) και ο FGF (50 nM) προήλθαν από την Alomone labs. Ο ειδικός για την PKCε πεπτιδικός ενεργοποιητής ψεRACK [CYGRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub> (TAT) \S-S/CHDAPIGYD –COOH] (1  $\mu\text{M}$ ) και ο PKCε ειδικός πεπτιδικός αναστολέας εV1-2 [CYGRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub> (TAT) \S-S/ EAVSLKPT] (1  $\mu\text{M}$ ) [289] συντέθηκαν στο Biopolymer Facility του Πανεπιστημίου της Maryland. Ο ψεRACK πεπτιδικός ενεργοποιητής της PKCε μιμείται την περιοχή πρόσδεσης της εRACK προάγοντας την πρόσδεση της PKCε στην εRACK και επάγοντας με τον τρόπο αυτό τη μετατόπιση και ενεργοποίησή της. Ο PKCε πεπτιδικός αναστολέας μετατόπισης εV1-2 που προέρχεται από την αλληλουχία της C2/V1 περιοχής της PKCε όπου προσδένεται η εRACK, προσδένεται στην εRACK και παρεμποδίζει την πρόσδεση της PKCε με την εRACK, προλαμβάνοντας τη μετατόπιση και ενεργοποίησή της. Τα πεπτίδια συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό με οδηγό Tat, πρωτεΐνη που προέρχεται από τον ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, για την πρόσληψή τους από τα κύτταρα.

Τα κύτταρα προεπώαστηκαν με όλους τους αναστολείς για 20 λεπτά, με εξαίρεση τον U73122 και την PTX που χορηγήθηκαν για 5 λεπτά και 16 ώρες αντίστοιχα, προτού προστεθούν οι αγωνιστές ή ενεργοποιητές για τους χρόνους που αναφέρονται, και σε όλη αυτή τη διάρκεια παρέμεναν στον επωαστικό κλίβανο των 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Σε ελάχιστες περιπτώσεις που η ενεργοποίηση προηγήθηκε της χορήγησης αναστολέα υπάρχει σχετική επισήμανση στα αποτελέσματα.



## 2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA

### 2.4.1. Απομόνωση ολικού RNA από ευκαριωτικά κύτταρα

RNA από διάφορες κυτταρικές σειρές απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Το TRIzol αποτελεί ένα ομογενές φαινολικό διάλυμα αποδιατακτών και αναστολέων RNAσών και χρησιμοποιείται σε διαδικασίες διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, από τα τρυβλία των 100 mm στα οποία έχουν καλλιεργηθεί τα κύτταρα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, προστίθεται 1 ml TRIzol και ακολουθεί απόξεση της επιφάνειας με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων και τη μεταφορά τους σε σωληνίσκους τύπου eppendorf, όπου παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στους 4°C, προστίθενται στο υπερκείμενο 0,2 ml χλωροφόρμιο για κάθε ml TRIzol που χρησιμοποιήθηκε, και αφού το εναιώρημα αναδευτεί καλά με ανακίνηση και επωαστεί 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C σε 12000 g. Στο σημείο αυτό το μείγμα έχει διαχωριστεί σε τρεις φάσεις. Το RNA κατακρημνίζεται από την υδάτινη φάση - αφού αυτή μεταφερθεί σε νέο eppendorf - με την προσθήκη 0,5 ml ισοπροπανόλης για κάθε ml TRIzol. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και μία τρίτη φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C σε 12000 g, ακολουθεί έκπλυση του RNA με τουλάχιστον 1 ml αιθανόλης 75%, φυγοκέντρηση, και επανάληψη της διαδικασίας ξεπλύματος. Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά όλη η ποσότητα αιθανόλης και το ίζημα στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 50 µl ελεύθερο ριβονουκλεάσης ddH<sub>2</sub>O (double distilled H<sub>2</sub>O). Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm και έλεγχος της καθαρότητας του RNA σε πηκτή αгарόζης.

### 2.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Για τη σύνθεση cDNA συμπληρωματικού του εξαχθέντος RNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση Superscript™ II RT (Invitrogen) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας παρασκευής το οποίο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Λήψη 1 µg RNA από κάθε δείγμα και τοποθέτησή του σε ξεχωριστά αποστειρωμένα σωληνάρια eppendorfs.
- Προσθήκη 10 ng/ml τυχαίων εκκινήτων (random primers), 1 µM dNTP Mix και ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 12 µl.
- Το περιεχόμενο των σωληναρίων αναδεύεται ήπια και φυγοκεντρείται στιγµιαία.

- Ακολουθεί αποδιάταξη του στους 65°C για 5 λεπτά και απευθείας τοποθέτηση των eppendorfs σε πάγο.
- Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση προστίθενται: 4 µl ρυθμιστικού διαλύματος 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, και 1 µl RNaseOUT (40 units/µl).
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων και επώαση στους 25°C για 2 λεπτά.
- Έπειτα ακολουθεί προσθήκη 1 µL (200 units) της SuperScript™ II RT, ανάδευση του μείγματος και επώαση στους 25°C για 10 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 10 λεπτών, τα δείγματα επωάζονται στους 42°C για 50 λεπτά.
- Τερματισμός της σύνθεσης του cDNA επιτυγχάνεται με επώαση για 15 λεπτά στους 70°C και η συντήρησή του προϋποθέτει φύλαξη στους -20°C.

#### 2.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ενός γνωστού μήκους τμήματος DNA και την επαγόμενη ανίχνευση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Platinum Taq Πολυμεράσης (Invitrogen). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο του CB1R σχεδιάστηκαν ώστε να αναγνωρίζουν το CB1R του ανθρώπου, του επίμου και της όρνιθας και είναι οι εξής:

5'-TCCAAATTAGGGTACTTCCCACAGAAATTC-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-CGTGAAGGT GCCCAGCGTGA-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

Οι συνθήκες της PCR για 50 µl αντίδρασης ήταν:

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPS (κάθε ένα), 0,2 µM Primer Mix (κάθε ένας), 1x PCR Buffer, 1.0 unit Taq Πολυμεράση, εκμαγείο DNA (DNA template) 0,5 µg, και συμπλήρωμα στα 50 µl με ddH<sub>2</sub>O.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

Μετουσίωση για 5 min στους 94°C ακολουθούμενη από 30 κύκλους ως εξής:

Μετουσίωση για 1 λεπτό στους 94°C

Αναδιάταξη για 1 λεπτό στους 59°C

Επιμήκυνση για 2 λεπτά στους 72°C

Και μετά το πέρας των 30 κύκλων επιμήκυνση για 10 λεπτά στους 72°C. Τα προϊόντα του PCR ανιχνεύθηκαν σε 2% πηκτή αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο.



## 2.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

### 2.5.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών και ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Τα κύτταρα επωάζονται με τους κατάλληλους αγωνιστές ή/και ανταγωνιστές σύμφωνα με την εκάστοτε συνθήκη. Για τη συλλογή των κυττάρων και την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών ή την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά διαλύματα, το RIPA buffer (10 mM Tris pH 7.5, 158 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X-100, 1% NaDoc) και το NP-40 buffer (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% NP-40, pH 8.0). Η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται ως εξής: τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS που βρίσκεται στους 0°C και προστίθεται το παγωμένο RIPA ή NP-40 διάλυμα, το οποίο περιέχει αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών (50 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 nM okadaic acid, 1 mM PMSF και cocktail αναστολέων πρωτεασών) [260]. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκολλώνται από το τρυβλίο με μηχανικό τρόπο, συλλέγονται με σύριγγα ινσουλίνης 26-27G, μεταφέρονται σε σωληνίσκους τύπου eppendorf και ομογενοποιούνται είτε με χρήση υπερήχων (sonication) είτε με τη χρήση της σύριγγας ινσουλίνης. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 4°C υπό ανάδευση, φυγοκέντρηση στις 13000 g για 20 λεπτά στους 4°C, και μεταφορά του υπερκλειμένου σε καινούρια eppendorfs. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στους 0°C, ενώ ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης.

Για την ανοσοκατακρήμνιση, τεχνική όπου πρωτεϊνικά αντιγόνα προσδένονται σε αντισώματα δημιουργώντας σύμπλοκα τα οποία ανοσοκατακρημνίζονται προκειμένου να απομονωθεί το αντίγονο από το ανοσοσύμπλοκο και να γίνει ηλεκτροφορητική ανάλυση, ακολουθείται σε πρώτη φάση η διαδικασία που μόλις περιγράφηκε για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών. Η όλη τεχνική στηρίζεται στην παρουσία πρωτεϊνών G που είναι δεσμευμένες σε σφαιρίδια αгарόξης τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών τάξης G, και να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες. Ταυτόχρονα με την προετοιμασία του κυτταρικού εκχυλίσματος, σφαιρίδια αгарόξης-πρωτεΐνης G (UBI) εξισορροπούνται σε PBS. Το εκχύλισμα επωάζεται με 20 μl σφαιριδίων αгарόξης (50%) για 30 min (pre-clearing) και ακολουθεί απομάκρυνση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στις 13000 g για 1 λεπτό. Στη συνέχεια το εκχύλισμα επωάζεται με 1 μg κατάλληλου αντισώματος στους 4°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα το σύμπλοκο του αντιγόνου με το αντίσωμα κατακρημνίζεται με τη βοήθεια νέων σφαιριδίων δεσμευμένα με αгарόξη, τα οποία επωάζονται με συνεχή περιστροφή με το



πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους 4°C για 4 τουλάχιστον ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000 g και το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα RIPA ή NP-40. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα κατεργασίας 2xLaemmli και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά προκειμένου να εκλουσθούν οι δεσμευμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες. Το δείγμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο φορτώνεται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

### 2.5.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η χρησιμοποίηση κατά την ηλεκτροφόρηση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνών, εφαρμόστηκε στα διαλυτοποιημένα δείγματα χρωματομετρική μέθοδος που στηρίζεται στην εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός αγνώστου δείγματος μετά από σύγκριση με γνωστές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης του ορού βοδιού (BSA).

Ο προσδιορισμός γίνεται με την μέθοδο Lowry (1957) η οποία βασίζεται στη δημιουργία ενός έγχρωμου σύμπλοκου που απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (595 nm). Πρώτα, τα ιόντα χαλκού αλληλεπιδρούν σε αλκαλικό περιβάλλον με τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που έχουν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, προστίθεται φωσφομολυβδαινικό-φωσφοβολφραμικό αντιδραστήριο (φαινολικό αντιδραστήριο Folin Ciocalteu), το οποίο ανάγεται από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο χαλκού- πρωτεΐνης προς κυανούν του μολυβδαινίου και κυανούν του βολφραμίου, αντίστοιχα.

Αναλυτικότερα η πορεία έχει ως εξής:

- Σε σωληνάρια τύπου Eppendorf προσθέτουμε 5 ή 10 μl δείγματος και συμπληρώνουμε με dH<sub>2</sub>O μέχρι να φτάσει τελικό όγκο 50 μl.
- Πρότυπη Καμπύλη: Αντίστοιχα, σε σωληνάρια τύπου Eppendorf προσθέτουμε BSA γνωστών συγκεντρώσεων (0, 5, 10, 20, 25 μg/μl) και 5 ή 10 μl διαλύματος ομογενοποίησης και συμπληρώνουμε με dH<sub>2</sub>O μέχρι να φτάσει τελικό όγκο 50 μl.
- Αναμειγνύονται 1 ml από το Αντιδραστήριο A (διάλυμα 0,5% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O σε 1% τρυγικό καλιονάτριο, Bio-Rad Laboratories) με 20 μl από το Αντιδραστήριο S (διάλυμα 2% NaCO<sub>3</sub> σε 0,1M NaOH, Bio-Rad Laboratories). Το διάλυμα αυτό αποτελεί το Αντιδραστήριο A' και παρασκευάζεται λίγο πριν από τον προσδιορισμό. Προστίθενται 25 μl από το Αντιδραστήριο A' στα δείγματα και ανακινούνται ελαφρά.
- Προστίθενται 200 μl από το Αντιδραστήριο B (Folin Ciocalteu, περιέχει άλατα Mo,

W και φωσφορικό όξυ, Bio-Rad Laboratories) στα δείγματα και ανακινούνται και πάλι.

- Τα δείγματα φορτώνονται σε πλακίδια 96 θέσεων.
- Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων σε φωτόμετρο Elisa (PR2100 reader).
- Με δεδομένο τις τιμές απορρόφησης των συμπλόκων της γνωστής ποσότητας της πρωτεΐνης BSA σχεδιάζεται μία πρότυπη καμπύλη, σύμφωνα με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος.

### 2.5.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

#### A) Προετοιμασία δειγμάτων

Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν και αφού προηγηθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, προστίθεται διάλυμα Laemmli (Laemmli sample buffer: SDS 10%, Glycerol 50%, BPB 1% dissolved in 10% EtOH, Tris 1M pH 6.8) σε τελική συγκέντρωση 1x που περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη σε συγκέντρωση 5% v/v και ακολουθεί θέρμανση στους 100°C για 5 λεπτά για πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης.

#### B) Προετοιμασία πηκτής SDS-PAGE και ηλεκτροφόρηση

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε κάθετη πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS-PAGE). Η ομοιόμορφη δέσμευση του φορτισμένου απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες τις κάνει να αποκτήσουν σταθερό αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα- παρουσία ηλεκτρικού πεδίου- η κινητικότητα τους να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων της πηκτής, η οποία ρυθμίζεται με τη μεταβολή της περιεκτικότητας της σε ακρυλαμίδιο.

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστίβαξης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις:

	Πηκτή διαχωρισμού			Πηκτή επιστίβαξης	
Χρησιμοποιούμενα Διαλύματα	8%	10%	12%		
		10ml			3ml
dH <sub>2</sub> O	4.6	4.0	3.3		2.1
Bis-ακρυλαμίδη (29:1)	2.7	3.3	4.0		0.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5	2.5	2.5	1M Tris (pH 6.8)	0.380
10% SDS	0.1	0.1	0.1		0.03
10% APS	0.1	0.1	0.1		0.03
TEMED	0.006	0.004	0.004		0.003

Στη συνέχεια, η διαδικασία έχει ως εξής:

- Τα δείγματα, συνήθως σε συγκέντρωση 25 µg πρωτεΐνης, φορτώνονται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.
- Προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad- Mini protean 3) ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (PAGE Buffer: Tris 125 mM, Glycine 1 M, SDS 0.5% w/v) και εφαρμόζεται σταθερή ηλεκτρική τάση 180 Volts, ώστε οι αρνητικά φορτισμένες, λόγω του SDS, πρωτεΐνες να μεταναστεύσουν προς το θετικό πόλο.
- Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν η ενδεικτική χρωστική μπλέ της βρωμοφαινόλης που εμπεριέχεται στο διάλυμα Laemmli των δειγμάτων, μεταναστεύσει στην άκρη της πηκτής στο θετικό πόλο.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή κατεργάζεται με ηλεκτρομεταφορά και πρόσδεση των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και ακολουθεί ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών.

#### 2.5.4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

Με την τεχνική αυτή, μπορούν να ανιχνευθούν πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος σε νιτροκυτταρίνη, απ' όπου ανιχνεύονται με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο. Ένα ένζυμο που βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το δεύτερο αντίσωμα δημιουργεί ένα έγχρωμο προϊόν παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος.



#### A) Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer: Tris 50 mM, Glycine 380 mM, Methanol 2%, SDS 0.4% w/v).

- Ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης (Whatmann, Protran, pore size 0.45μm) και τέσσερα κομμάτια χαρτιού Whatmann 3 MM μεγέθους ελάχιστα μεγαλύτερου από την πηκτική, εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
- Στην πλάκα της συσκευής που εφαρμόζεται ο θετικός πόλος τοποθετούνται τα υλικά ως εξής: δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann 3 MM, η νιτροκυτταρίνη, η πηκτική πολυακρυλαμίδιου - χωρίς να εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα, τα 2 απορροφητικά χαρτιά Whatmann και τέλος, η πλάκα της συσκευής που θα εφαρμοστεί ο αρνητικός πόλος.
- Η ηλεκτρική μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στους 4°C με ρεύμα σταθερής τάσης 400 mA. Η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς καθορίστηκε από το μέγεθος των πρωτεϊνών, συνήθως μιάμιση ώρα για πρωτεΐνες με M.B έως 50 kDa, δύο ώρες για M.B έως 100 kDa και τρεις ώρες για πρωτεΐνες με M.B άνω των 100 kDa.

#### B) Αντίδραση και ανίχνευση των πρωτεϊνών

- Κατόπιν η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση σε 5% κ.β. BSA (αλβουμίνη του ορού βοδιού) ή άπαχο γάλα (στην περίπτωση που πρόκειται να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη PKCε) σε TBST (Tris 2 M, NaCl 5 M, Tween 0.1%) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών πάνω στη νιτροκυτταρίνη από τις πρωτεΐνες της BSA ή του γάλακτος.
- Ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 5% BSA ή άπαχο γάλα σε TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με διάλυμα TBST.
- Πραγματοποιείται επώαση της νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (1:3000 σε TBST) ή υπεροξειδάση του ραπανιού (1:7000 σε TBST) (Santa-Cruz) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα 3 εκπλύσεις με διάλυμα TBST. Σε ορισμένες αναλύσεις ανοσοκατακρημνίσεων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τις ελαφρές αλυσίδες των IgG που δεν αναγνωρίζει τις βαριές μοριακού βάρους 55 kDa αλυσίδες (Jackson ImmunoResearch).

- Αν το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης, τότε, μετά τις εκπλύσεις, ακολουθεί επώαση με διάλυμα αλκαλικού pH (NaCl 100 mM, Tris 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9.5) για 10 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη των κατάλληλων αντιδρώντων της αλκαλικής φωσφατάσης (0,5 g του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-φωσφορικό (BCIP) σε 10 ml 100% διμεθυλφορμαμίδης, και 0,5 g της χρωστικής κυανό του νιτροτετραζολίου (NBT) σε 10 ml 70% διμεθυλφορμαμίδης) μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η αντίδραση σταματάει με 50 mM EDTA σε PBS.
- Αν το δευτερεύον αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού, τότε, μετά τις εκπλύσεις με TBST, προστίθενται τα κατάλληλα υποστρώματα του ενζύμου (Santa-Cruz, Luminol Reagent) πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για ένα λεπτό και, ακολούθως, χρησιμοποιείται φωτογραφικό φιλμ (Fujitsu) για την ανίχνευση της χημειοφωταύγειας, η οποία παράγεται κατά την αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας ανάλογα με την πρωτεΐνη που θέλαμε να ανιχνεύσουμε είναι τα εξής:

- Πολυκλωνικά αντισώματα κασίκας (pAbs) έναντι της phospho-PKCε.
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι των CB1R, Fyn, GFP, phospho-Fyn (Thr-12), phospho-EGFR (Tyr845) και phospho-MARCKS πρωτεϊνών προερχόμενα από τη Santa Cruz (Santa Cruz, CA) της pan-phospho-PKC από τη Cell Signaling της PKCζ από τη Gibco των phospho-Src (PY418) και Src από τη Biosource, και του FGFR από τη UBI.
- Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού (mAbs) έναντι των HA, MARCKS, phospho-ERK1/2, phospho-tyrosine (PY99), H-Ras, c-Raf-1 και PKCε ήταν, επίσης, προϊόντα της Santa Cruz της anti-tubulin III (Tuj1) της Covance των p120GAP και p120 της Upstate Biotechnology της PKCδ από τη Cell Signaling, και των actin και β-tubulin της Sigma.

#### 2.5.5. Δοκιμασία Δραστηριότητας Ras (RBD pull down assay)

Η μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων της ενεργής Ras σε κυτταρικά εκχυλίσματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις ενεργοποιημένες Ras GTPάσες αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη μόνο όταν αυτή είναι συνδεδεμένη με GTP, και συνεπώς, με την τεχνική αυτή καθίσταται δυνατή η ανίχνευση του ποσοστού της πρωτεΐνης Ras που βρίσκεται ενωμένη με GTP. Επιπλέον, η



δέσμευση της Ras με το ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή δέσμευσης της Ras της πρωτεΐνης Raf, RBD (Ras binding domain), παρεμποδίζει την ενδογενή και την επαγόμενη από τις πρωτεΐνες GAP δράση της ως GTPάση. Έτσι, η περιοχή RBD της πρωτεΐνης Raf χρησιμοποιείται για κατακρήμνιση συγγένειας της ενεργής Ras-GTP.

Η τεχνική συνοπτικά έχει ως εξής:

#### A. Προετοιμασία των βακτηριακών GST-fusion υποστρωμάτων

- Μεταφέρονται DH5a/GST-RBD βακτήρια σε 3 ml υγρού LB παρουσία αμπικιλίνης (100 µg/ml) και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες.
- Προστίθενται 2 ml από την προηγούμενη καλλιέργεια σε 200 ml φρέσκου LB με αμπικιλίνη
- Ακολουθεί επώαση 2-3 ώρες μέχρι η OD<sub>600</sub> να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 – 0,8.
- Αφαιρείται 1 ml για non-induced control και στα υπόλοιπα προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Ακολουθεί επώαση 3-4 ώρες στους 37°C.
- Αφαιρείται 1 ml και μαζί με το προηγούμενο (non-induced control), μετά από φυγοκέντρηση, ακολουθεί η διαδικασία για προσδιορισμό της έκφρασης της GST-RBD με Western Blotting και αντίσωμα GST.
- Τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 3500 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C σε aliquots των 25 ml και το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C, αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο και το ίζημα παγώσει απότομα με ξηρό πάγο/αιθανόλη.

#### B. Ένωση των GST υποστρωμάτων με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης

- Το ίζημα των GST-RBD πρωτεϊνών αναδιαλύεται σε 8,6 ml H<sub>2</sub>O και προστίθενται 100 µl λυσοζύμης για διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.
- Επώαση σε πάγο για 10 λεπτά με συχνές αναδεύσεις κατά τη διάρκεια των οποίων προστίθενται 10 µg/ml leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> και PMSF.
- Μετά προστίθενται 1 ml 10x PBS, 1 mM EDTA και 1 mM DTT.
- Το κύτταρα λύνονται μηχανικά με σύριγγα 21-G, το εκχύλισμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 4 °C και προστίθεται 1 ml Triton X-100 σε PBS.
- Στο μεταξύ έχει πραγματοποιηθεί έκπλυση των σφαιριδίων γλουταθειόνης και αναδιάλυσή τους σε PBS.
- Το υπερκείμενο του διαλυμένου σε Triton X-100 GST υποστρώματος προστίθεται σε 20 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης και επωάζεται στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση για 16 ώρες.



- Την επόμενη ημέρα τα προσδεδεμένα με GST-RBD σφαιρίδια γλουταθειόνης φυγοκεντρούνται, ξεπλένονται με PBS, και τελικά αναδιαλύονται σε PBS που περιέχει 10% γλυκερόλη και 0,1% Triton X-100.

#### Γ. Δοκιμή GST – RBD

- Τα κύτταρα συλλέγονται από τα τρυβλία με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης MLB (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40, pH 7,5) και ακολουθεί η συνήθης διαδικασία απομόνωσης ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.
- 350-500 µg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος επωάζονται για 1 ώρα στους 4°C με 20 µl σφαιριδίων γλουταθειόνης τα οποία έχουν προσδεδεμένα GST-RBD.
- Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται εκπλένονται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης MLB, προστίθεται 2x Laemmli buffer, ακολουθεί βρασμός, ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και η μέθοδος Western για την ανίχνευση της ενεργής Ras.

#### 2.5.6. Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών ηλεκτροφόρησης

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κάθε υπό μελέτη πρωτεΐνης ομαλοποιήθηκαν στα πρωτεϊνικά επίπεδα μιας άλλης πρωτεΐνης που αποτελεί το μάρτυρα και της οποίας τα επίπεδα δεν επηρεάζονται από τις ουσίες που χορηγούμε στα κύτταρα, όπως ακτίνης, τουμπουλίνης, p120GAP και αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH). Τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της Western blot ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Image J πρόγραμμα ανάλυσης. Το Image J χρησιμοποιεί μια διαδικασία αποκαλούμενη ποσοτικός προσδιορισμός για να συγκρίνει τη σχετική σκοτεινότητα των διαφορετικών ζωνών στην ανιχνευμένη εικόνα. Η μέθοδος ενσωμάτωσης όγκου χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί η σχετική πυκνότητα των ζωνών στις διαφορετικές λωρίδες. Η αριθμητική τιμή κάθε εικονοκυττάρου μέσα σε μια ορισμένη περιοχή προστίθεται μαζί. Το σύνολο αντιπροσωπεύει το ποσό του δείγματος που περιλαμβάνεται μέσα σε ορισμένη περιοχή. Ένα τμήμα από αυτό το σύνολο αποδίδεται στο υλικό του υποβάθρου και πρέπει να αφαιρεθεί έτσι ώστε το πραγματικό ποσό του δείγματος να αντιπροσωπεύεται στην ανάλυση της σύγκρισης των ζωνών.

### 2.5.7. Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία 12 ή 48 θέσεων, στα οποία έχουν ήδη τοποθετηθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Μετά από την επώαση των κυττάρων με τους κατάλληλους αγωνιστές ή/και ανταγωνιστές ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες, ακολουθεί η μονιμοποίησή τους και η δοκιμασία ανοσοφθορισμού. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, το πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA και το πρωτόκολλο μονιμοποίησης για την ανίχνευση μικροσωληνίσκων και μικροϊνιδίων.

#### *Πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA*

Στο πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων και γίνεται μία έκπλυση με PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα μονιμοποίησης 4% PFA (paraformaldehyde, PFA) σε PBS που παραμένει για 15 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 2 λεπτών με PBS, διαπερατοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης με διάλυμα 0.1% Triton-X σε PBS για 2 λεπτά και άλλες 3 εκπλύσεις με PBS. Έπονται επώαση των κυττάρων με διάλυμα 3% ορού σε PBS για 30 λεπτά για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης για το πρωτογενές αντίσωμα (blocking) και 16 ώρες επώασης στους 4°C με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα 3% ορού σε PBS. Την επόμενη ημέρα λαμβάνουν χώρα 3 εκπλύσεις των 2 λεπτών με PBS, 1 ώρα επώαση των κυττάρων με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με πράσινο ή κόκκινο φθορόχρωμα, και επαναλαμβάνονται οι εκπλύσεις με PBS. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert 200M), συνδεδεμένο με σύστημα φωτογράφησης (Hamamatsu Orca-ER CCD camera) και πρόγραμμα ανάλυσης φωτογραφιών (SlidebookTM software).

#### *Πρωτόκολλο μονιμοποίησης DSP*

Στο πρωτόκολλο μονιμοποίησης για την ανίχνευση μικροσωληνίσκων και μικροϊνιδίων, αντικαθίσταται το θρεπτικό μέσο με διάλυμα 1 mM DSP (Pierce) σε HBSS για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει το cross-linking των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, το διάλυμα 1 mM DSP σε HBSS, αντικαθίσταται από διάλυμα 1 mM DSP σε Tsb (0.5% Triton-X σε SB) για 10 λεπτά στους 37°C για να γίνει η εκχύλιση. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις 1 λεπτού με Tsb. Η μονιμοποίηση γίνεται σε διάλυμα 4% PFA σε SB (1 mM EGTA, 4% Polyethylene Glyco 8000, 0.0015% phenol red, 100 mM PIPES, pH 6.9) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται με διάλυμα blocking, 3% ορού σε PHEM (60



mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.9) για 30 λεπτά και ακολουθεί η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα 3% ορού σε RHEM για 16 ώρες στους 10°C, 3 εκπλύσεις σε RHEM, 1 ώρα επώαση των κυττάρων σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε RHEM, και επανάληψη των εκπλύσεων με RHEM. Τέλος, πραγματοποιείται μία έκπλυση 5 λεπτών με PBS.

## 2.6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ «ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ»

Για την απομόνωση των λιπιδικών σχεδίων χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο που δεν περιλαμβάνει την προσθήκη απορρυπαντικού, προκειμένου η απομόνωση και ο διαχωρισμός των λιπιδικών σχεδίων από περιοχές πλούσιες σε καβεολίνη, μη λιπιδικές πλασματικές μεμβράνες και από μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi να είναι κατά το μέγιστο ακριβής [290]. Η μέθοδος περιλαμβάνει, αρχικά, συλλογή των κυττάρων (4 τρυβλία των 100 mm για κάθε συνθήκη) σε Base buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 250 mM σουκρόζη) στο οποίο έχει προστεθεί Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>, φυγοκέντρησή τους στις 1000 g για 2 λεπτά και αναδιάλυση σε 1 ml Base buffer που περιέχει αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύνονται μηχανικά μέσω περάσματος από 23G βελόνα, φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά, και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέους σωληνίσκους (postnuclear 1), ενώ το ίζημα λύνεται ξανά με 23G βελόνα μετά από προσθήκη επιπλέον 1 ml Base buffer (+αναστολείς) και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 1000 g. Το δεύτερο υπερκείμενο (postnuclear 2) ενώνεται με το πρώτο (postnuclear 1) και σε αυτά προστίθενται 2 ml από 50% OptiPrep (Axis-Shield) σε Base buffer χωρίς Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>. Το διάλυμα (υπερκείμενο και 50% OptiPrep 1:1) αφού ανακινηθεί ήπια μεταφέρεται στον πυθμένα σωληνίσκων υπερφυγοκέντρου και πάνω από αυτό στοιβάζονται προσεκτικά 6 ml διαβαθμίσεων 0-20% OptiPrep (1,2 ml από 20%, 16%, 10%, 5% και 0% OptiPrep) σε Base buffer. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 25500 rpm για 90 λεπτά και κατόπιν συλλέγονται σε συνέχεια 670 μl από 14 συνολικά κλάσματα, τα οποία υπόκεινται σε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης μετά από βρασμό σε διάλυμα Laemmli. Σε προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των κλασμάτων με γνωστούς δείκτες λιπιδικών σχεδίων (H-Ras και Flotillin), και προσδιορίστηκε το περιεχόμενο της πρωτεΐνης κάθε κλάσματος, όπου βρέθηκε ότι η συγκέντρωση πρωτεϊνών είναι σχεδόν διπλάσια στα τελευταία κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων (κλάσματα 4 και 5) σε σχέση με τα πρώτα (κλάσματα 1 και 2).



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

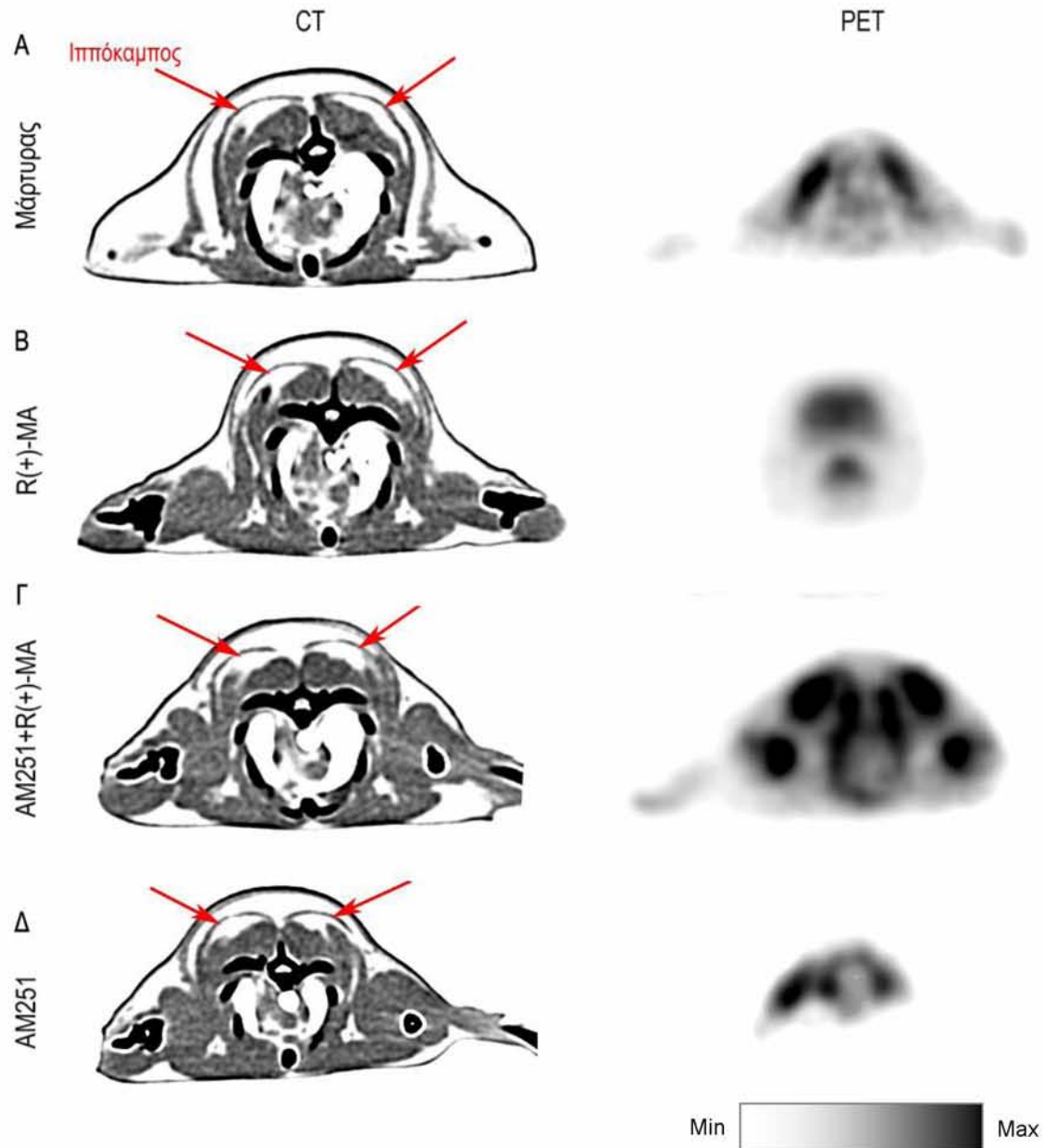
#### **3.1. ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΡΕΤ ΣΤΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΠΙΜΥ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΝΗΜΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΟΞΙΚΩΣΗ ΜΕ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ**

Προκειμένου να μελετήσουμε, αρχικά σε οργανισμικό επίπεδο, το ρόλο των υποδοχέων των κανναβινοειδών στη λειτουργική μνήμη και τον πιθανό συσχετισμό της ενεργοποίησής τους με τη δράση και την έκφραση της PKC, προσπαθήσαμε να χαρτογραφήσουμε τις περιοχές του εγκεφάλου που αναπτύσσουν δευτερογενείς αλλαγές στο μεταβολισμό με χρήση ποζιτρονικής τομογραφίας (PET). Καθώς ο ιππόκαμπος και ο μετωπιαίος φλοιός συνδέονται άμεσα με τη λειτουργική μνήμη, οι περιοχές αυτές αποτέλεσαν τα σημεία στα οποία εστιάστηκε το ενδιαφέρον μας.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας σα ζωϊκό μοντέλο επίμυες. Οι επίμυες, 20 λεπτά αφότου κατανεμήθηκαν σε ομάδες στις οποίες τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά είτε μάρτυρας, είτε αγωνιστής του CB1 υποδοχέα (μεθανανδαμίδη, R(+)-MA), είτε ανταγωνιστής (AM251) ή συνδυασμός των δύο, εκτέλεσαν δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων και αμέσως μετά τους χορηγήθηκε το ραδιοϊσότοπο προκειμένου να υποβληθούν σε PET (βλ. υλικά και μεθόδους 2.1. Πρωτόκολλο PET/CT). Εναλλακτικά, τα διαλύματα χορηγήθηκαν αμέσως μετά την T1 δοκιμή της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένων. Η χορήγηση των κανναβινοειδών σε συνδυασμό με τη δοκιμασία μνήμης που πραγματοποιήθηκε ώστε να ενδυναμωθεί η ένταση της ενεργοποίησης των περιοχών ενδιαφέροντος, αναμενόταν να προκαλέσει σημαντική αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας στις περιοχές αυτές.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μειωμένη χωρική διακριτική ικανότητα και ευαισθησία του συμβατικού ποζιτρονικού τομογράφου να σκιαγραφήσει με ακρίβεια τη μεταβολική δραστηριότητα συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου μικρών ζώων εργαστηρίου. Συγκεκριμένα, παρόλο που η αξονική τομογραφία απεικόνισε ευκρινώς την ανατομία του εγκεφάλου και την οριοθέτηση διακριτών περιοχών, όπως ο ιππόκαμπος, η ποζιτρονική τομογραφία παρουσίασε μειωμένη δυνατότητα ανίχνευσης οποιασδήποτε μεταβολικής δραστηριότητας στην περιοχή αυτή (**Εικ. 9**). Σε γενικές γραμμές τα πειράματά μας κατέδειξαν διαφορετική συνολική μεταβολική δραστηριότητα ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες, αλλά μη ανιχνεύσιμη στις σημαντικές για τη μνήμη περιοχές. Για παράδειγμα, οι ομάδες ελέγχου (μάρτυρες) και αυτές που έλαβαν τον AM251 ανταγωνιστή του CB1 υποδοχέα (**Εικ. 9Α και Δ**)

εμφάνισαν αυξημένη ενεργοποίηση σε διαφορετικές περιοχές εν συγκρίσει με τις ομάδες στις οποίες είχε χορηγηθεί αγωνιστής του CB1 υποδοχέα (R(+)-MA) (**Εικ. 9B**)· ωστόσο ήταν αδύνατη η ακριβής διάκρισή τους.

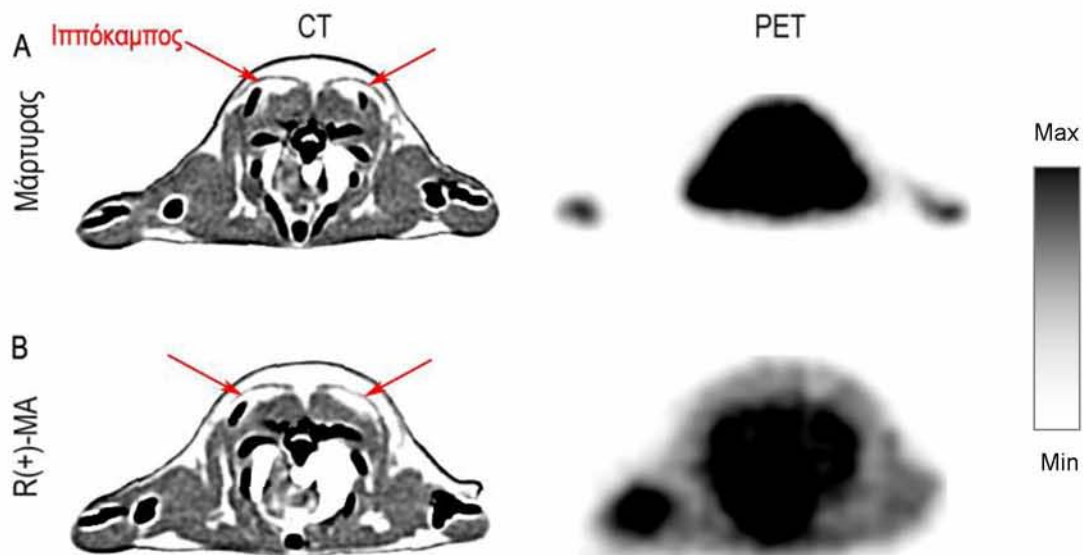


**Εικόνα 9.** Στεφανιαίες τομές από ψηφιακές εικόνες CT και PET εγκεφάλου επιμύων στις οποίες διακρίνονται ξεκάθαρα οι περιοχές του ιππόκαμπου. Επίμυες στους οποίους είχε χορηγηθεί (Α) μάρτυρας, (Β) R(+)-MA (2.5 mg/kg), (Γ) AM251 (1 mg/kg) και R(+)-MA (2.5 mg/kg) ή (Δ) AM251 (1 mg/kg), εκτέλεσαν δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένων και, αφού χορηγήθηκε σε αυτούς το ραδιοφάρμακο ( $^{18}\text{F}$ -FDG 200  $\mu\text{Ci}$ ), υποβλήθηκαν σε CT και PET μετά από αναισθησία (βλ. υλικά και μεθόδους 2.1. Πρωτόκολλο PET/CT). Τυπικές ενδεικτικές εικόνες CT (αριστερό πάνελ) και PET (δεξιό πάνελ) στις οποίες διακρίνεται η ανατομία, αλλά όχι η ενεργοποίηση του ιππόκαμπου, αντίστοιχα, σε κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες. Τα χρώματα των εικόνων της PET έχουν αντιστραφεί με αποτέλεσμα τα πιο σκούρα να υποδηλώνουν μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα.



Ποικίλες τροποποιήσεις του αρχικού πρωτοκόλλου PET/CT επιχειρήθηκαν προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία απεικόνισης διακριτών περιοχών και να ληφθούν περισσότερο ακριβείς εικόνες, χωρίς όμως να επιφέρουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Προκειμένου να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο ο χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα στη χορήγηση των διαλυμάτων και στη λήψη των εικόνων (~ 90 λεπτά) να είναι υπεύθυνος για την εξασθένηση του σήματος ενεργοποίησης των εν λόγω περιοχών, τα διαλύματα χορηγήθηκαν και ακολούθησε ποζιτρονική τομογραφία χωρίς να παρεμβληθεί η δοκιμασία μνήμης. Στην περίπτωση αυτή η μεταβολική δραστηριότητα εμφανίστηκε τόσο έντονη σε σημείο που δεν ήταν διακριτή καμία εγκεφαλική περιοχή (**Εικ.10**). Παρά ταύτα, μετά τη χορήγηση R(+)-MA ανιχνεύθηκε αλλαγή της μεταβολικής δραστηριότητας σε περιοχές του φλοιού (**Εικ.10B**), χωρίς ωστόσο να μπορεί να πραγματοποιηθεί εντοπισμός του ιππόκαμπου.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η συμβατική ποζιτρονική τομογραφία αποδείχθηκε αδύναμο εργαλείο για το συσχέτισμό σε πραγματικό χρόνο των προκαλούμενων από κανναβινοειδή μνημονικών ελλειμάτων με τη δράση της PKCε σε εγκεφαλικές περιοχές που ασκούν τον έλεγχο της λειτουργικής μνήμης. Ως εκ τούτου, η συμμετοχή των PKC στο μονοπάτι των CB1 υποδοχέων θα καθοριστεί σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο στα κεφάλαια που ακολουθούν.



**Εικόνα 10.** Στεφανιαίες τομές από ψηφιακές εικόνες CT και PET εγκεφάλου επιμύων στις οποίες διακρίνονται ξεκάθαρα οι περιοχές του ιππόκαμπου. Επίμυες στους οποίους είχε χορηγηθεί (A) μάρτυρας ή (B) R(+)-MA (2.5 mg/kg) για 15 λεπτά, υποβλήθηκαν σε CT και PET μετά από αναισθησία, αφού πρώτα χορηγήθηκε σε αυτούς ραδιοφάρμακο ( $^{18}\text{F}$ -FDG 0,5 mCi) (χωρίς δηλαδή να προηγηθεί δοκιμασία μνήμης). Τυπικές ενδεικτικές εικόνες CT (αριστερό πάνελ) και PET (δεξιό πάνελ) στις οποίες διακρίνεται η ανατομία, αλλά όχι η ενεργοποίηση του ιππόκαμπου, αντίστοιχα. Τα χρώματα των εικόνων της PET έχουν αντιστραφεί ώστε τα πιο σκούρα υποδηλώνουν μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα.

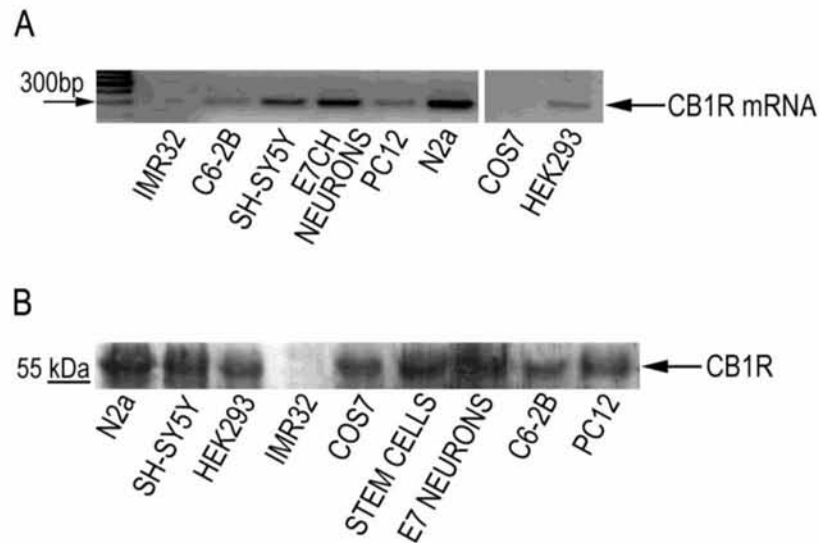


### 3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ CB1 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

#### 3.2.1. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του CB1R σε φλοιϊκούς νευρώνες νεοσσού όρνιθας σχετιζόμενα με νευριτική ανάπτυξη

Ο CB1 υποδοχέας (CB1R), όπως έχει ήδη αναφερθεί, εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και μάλιστα σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον ιππόκαμπο, στην παρεγκεφαλίδα, στα βασικά γάγγλια και στο φλοιό, ενώ απουσιάζει από τον προμήκη μυελό και το εγκεφαλικό στέλεχος. Για τη μελέτη των μοριακών γεγονότων που συνιστούν τους εγγύς μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (proximal signaling) από το CB1 υποδοχέα στην ενεργοποίηση της ERK σε νευρωνικό κυτταρικό περιβάλλον και σχετίζονται με τις παρατηρούμενες συμπεριφορικές επιδράσεις των κανναβινοειδών, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων προερχόμενες από τον τελεγκέφαλο νεοσσού όρνιθας [260, 287]. Πρωτοπόρες μελέτες σε παγκόσμιο επίπεδο, ανάμεσά τους και της ομάδας των Δρ. Σακελλαρίδη και Δρ. Βερναδάκη, και ακολούθως της Δρ. Μάγκουρα, ανέδειξαν τις E6 και E7 εμβρυϊκές ημέρες ως τη χρονική περίοδο που παύει ο πολλαπλασιασμός των νευροβλαστών και ξεκινά η νευρωνική διαφοροποίηση, καθιστώντας τους E6 και E7 μεταμιτωτικούς νευρώνες, κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της νευρωνικής διαφοροποίησης [259, 287, 319]. Η έκφραση του mRNA του CB1 υποδοχέα μελετήθηκε σε διάφορες κυτταρικές σειρές με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για τον εντοπισμό του CB1R όρνιθας, ανθρώπου και αρουραίου. Μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια, οι φλοιϊκοί E7 νευρώνες όρνιθας εκφράζουν υψηλά επίπεδα mRNA του CB1R (**Εικ. 11Α**) σε σύγκριση με άλλα νευρωνικά κυτταρικά περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA του CB1R στους E7 νευρώνες συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα mRNA προερχόμενα από C62B κύτταρα γλοιώματος, N2a κύτταρα από νευροβλάστωμα μυός, PC12 κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος επίμυ και SH-SY5Y κύτταρα από ανθρώπινο νευροβλάστωμα, καθώς επίσης και από εμβρυονικά βλαστοκύτταρα ή επιθηλιακές κυτταρικές σειρές HEK293 και COS7 που εκφράζουν ελάχιστα τον CB1 υποδοχέα σε μεταγραφικό επίπεδο. Αντίθετα, η IMR32 κυτταρική σειρά από ανθρώπινο νευροβλάστωμα δε βρέθηκε να εκφράζει καθόλου mRNA του CB1R. Αντίστοιχα, τα επίπεδα της CB1R πρωτεΐνης βρέθηκαν να ανταποκρίνονται στα επίπεδα του mRNA κάθε κυτταρικής σειράς που μελετήθηκε και ο υψηλότερος εμπλουτισμός της παρατηρήθηκε στους E7 νευρώνες (**Εικ. 11Β**). Σε όλες τις σειρές ο CB1R ανιχνεύεται σε μια ευρεία ζώνη, μοριακού βάρους 55-65 kDa, γεγονός που

υποδηλώνει πως ο υποδοχέας έχει μεταφραστική τροποποίηση και συγκεκριμένα γλυκοζυλιώνεται.

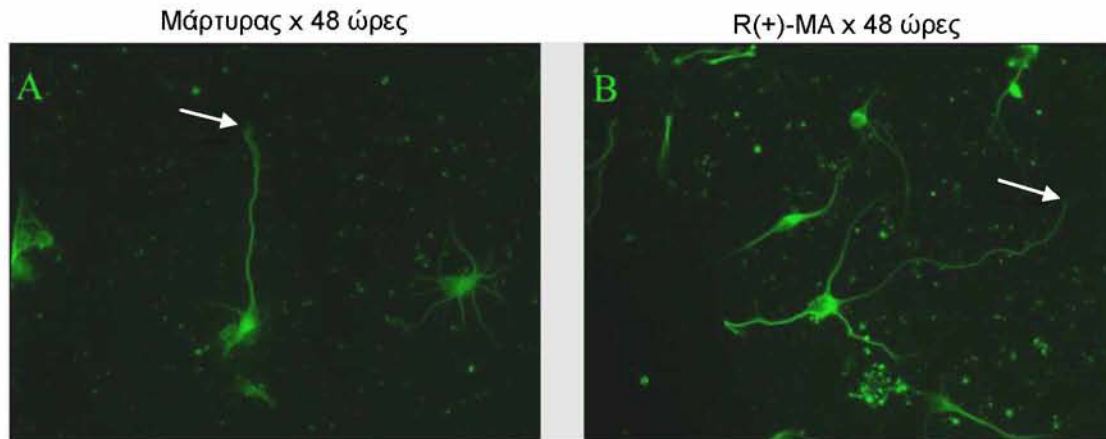


**Εικόνα 11.** Πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες E7 νεοσσού όρνιθας εκφράζουν υψηλά επίπεδα CB1R (A) mRNA (ημιποσοτικό RT-PCR) και (B) πρωτεΐνης (ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western, Western blotting), εν συγκρίσει με ίδια ποσοτικά επίπεδα (1  $\mu$ g RNA και 20  $\mu$ g πρωτεΐνης, αντίστοιχα) άλλων νευρικών και επιθηλιακών κυτταρικών σειρών. Το βέλος αριστερά του A στοχεύει στο δείκτη μεγέθους DNA 300 bp, και η γραμμή στο B υποδεικνύει το σημείο που βρίσκεται ο μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστού μοριακού μεγέθους 55 kDa (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

Εκτός από την υψηλή έκφραση των CB1 υποδοχέων στους E7 νευρώνες, μακρόχρονη επώασή τους με τον επιλεκτικό για το CB1R αγωνιστή μεθανανδαμίδη (R(+)-MA) επέφερε αύξηση στο μέσο μήκος του νευράξονα των νευρώνων. Εντοπίστηκε νευριτική ανάπτυξη, στατιστικά σημαντική, μετά από 48 ώρες επώασης με R(+)-MA, όταν το μέσο μήκος του κύριου νευρίτη που προέκυψε από μετρήσεις 120 νευρώνων που επιλέχθηκαν τυχαία έφτασε τα  $44 \pm 0.98 \mu\text{m}$ , παρουσιάζοντας 37.5% αύξηση εν συγκρίσει με το  $32 \pm 1.22 \mu\text{m}$  μέσο μήκος των νευρώνων που επωάστηκαν με μάρτυρα ( $P < 0.01$ ) (**Εικ. 12**).

Η παρατηρούμενη νευριτική ανάπτυξη από κανναβινοειδή πιθανότατα να σχετίζεται με ενεργοποίηση της ERK, σύντομη ενεργοποίηση της οποίας έχει συνδεθεί με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παρατεταμένη με διαφοροποίηση [223]. Τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν επιπρόσθετα στοιχεία για τη λειτουργική σημασία της ενεργοποίησης της ERK από το CB1R και της μελέτης των μοριακών μηχανισμών της ενεργοποίησής της.



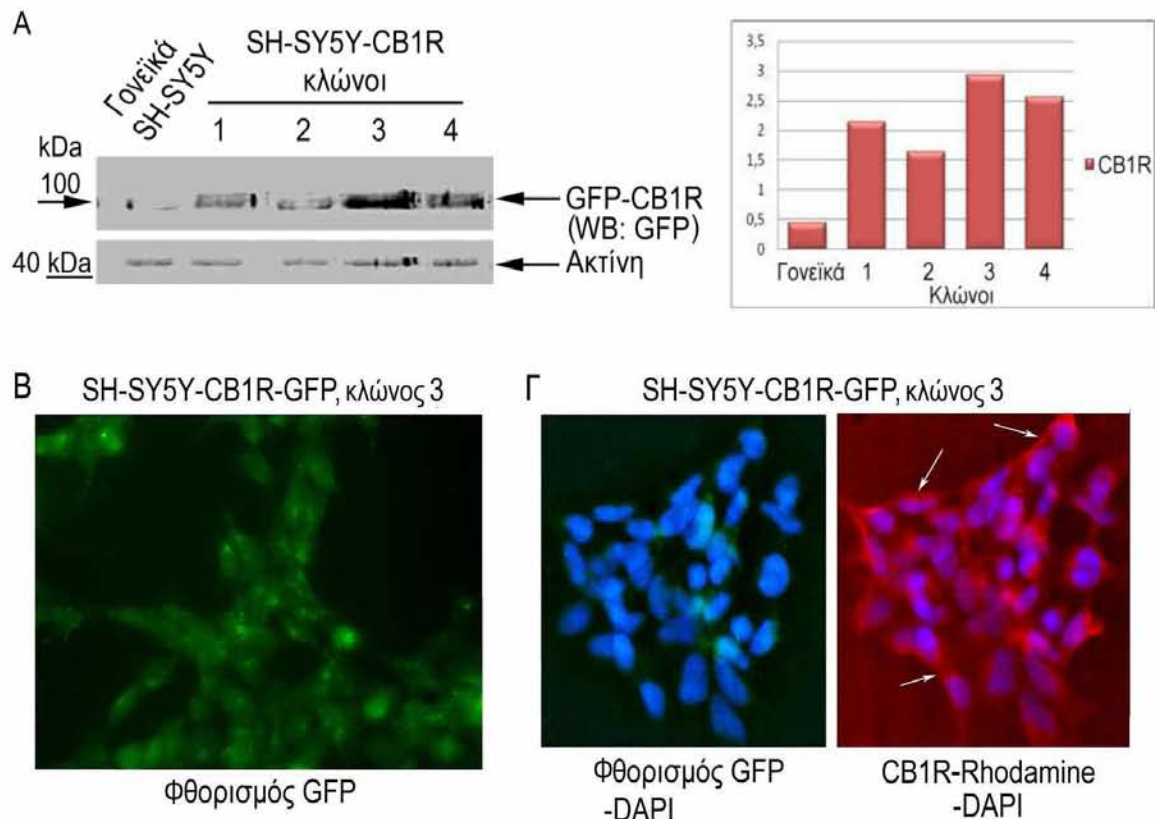


**Εικόνα 12.** Η R(+)-MA επάγει αύξηση στο μήκος του νευράξονα. Αντιπροσωπευτικό δείγμα νευρώνων που είτε επωάστηκαν με (A) μάρτυρα, είτε με (B) R(+)-MA για 48 ώρες. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της Tuj1 (β-τουμπουλίνη τάξη III) και ακόλουθη σήμανση με πράσινο φθορόχρωμα (FITC). Η έκθεση σε R(+)-MA βρέθηκε να επάγει μέση αύξηση 37.5% στον κύριο νευρίτη έναντι της ομάδας ελέγχου ( $P < 0.01$ ), αποτέλεσμα που προέκυψε από ποσοτικοποίηση της αύξησης του μήκους των νευριτών με το πρόγραμμα Neuron J ( $n = 120$  νευρώνες ανά συνθήκη).

### 3.2.2. Δημιουργία κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος SH-SY5Y που υπερεκφράζει σταθερά τον EGFP-CB1R (SH-SY5Y-CB1R)

Καθώς η μελέτη των μοριακών μηχανισμών σε πρωτογενείς νευρώνες επιφέρει ποικίλους περιορισμούς, ως επί το πλείστον χρονικούς, καταλήξαμε στην ανάγκη χρησιμοποίησης επιπλέον μίας κυτταρικής σειράς που θα μας επιτρέψει να συμπεράνουμε αν οι προτεινόμενοι μηχανισμοί ισχύουν σε περισσότερα από ένα νευρωνικά περιβάλλοντα. Η κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y που αποτελεί ένα παγκόσμια αποδεκτό μοντέλο μελέτης νευρωνικής λειτουργίας με ενδεδειγμένη χαρακτηρισμό, βρέθηκε να εκφράζει μέτρια επίπεδα CB1R (**Εικ. 11**), και ως εκ τούτου επιλέχθηκε προκειμένου να υπερεκφραστεί σταθερά ο CB1R, ώστε, στη συνέχεια, τα επίπεδα του υποδοχέα να ανταποκρίνονται στα επίπεδα έκφρασής του σε πρωτογενείς νευρώνες. Μετά τη διαμόλυνση (transfection) των SH-SY5Y κυττάρων με το αντίστοιχο CB1R-EGFP cDNA (για το πλασμίδιο, τις συνθήκες RT και τη διαμόλυνση βλ. υλικά και μεθόδους), την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων με G418 που προσφέρει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη, και την επιλογή των πιο σταθερών αποικιών με κυλίνδρους, προέκυψαν 4 διαφορετικοί κλώνοι-κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν σταθερά τον CB1R-EGFP (SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά) (**Εικ.13Α**). Καθώς ο κλώνος 3 υπερεκφράζει σταθερά τον EGFP-CB1R περίπου 6,5 φορές περισσότερο από τα γονεϊκά κύτταρα, όπως αποκάλυψε ανάλυση πυκνομετρίας, και τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα είναι συγκρίσιμα με αυτά των πρωτογενών νευρώνων, η σειρά αυτή (κλώνος 3)

χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Ταυτόχρονα, μέσω απεικόνισης με φθορισμό τεκμηριώθηκε ότι όλα τα κύτταρα της επιλεγμένης κυτταρικής σειράς εκφράζουν το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*EGFP*), και άρα και τον υποδοχέα (**Εικ. 13B**), και στη συνέχεια, διερευνήθηκε με ανοσοκυταροχημεία ο εντοπισμός του CB1 υποδοχέα και η τοποθέτηση του γονιδίου που υπερεκφράσαμε (**Εικ. 13Γ**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο EGFP-CB1R γλυκοζυλιώνεται και εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη.



**Εικόνα 13.** Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y-CB1R υπερεκφράζει σταθερά τον CB1R. (A) Ανοσοαποτύπωση στην οποία ανιχνεύεται με GFP αντίσωμα ο CB1R-EGFP (M.B ~100 kDa) στους διάφορους κυτταρικούς κλώνους που προέκυψαν μετά από διαμόλυνση και επιλογή των πιο σταθερών αποικιών, αποκάλυψε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του CB1R στον κλώνο 3 εν συγκρίσει με αυτά των υπόλοιπων κλώνων σε ίσα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα (25μg ολικής πρωτεΐνης) (αριστερό πάνελ). Οι εντάσεις των πρωτεϊνικών ζωνών καθορίστηκαν με αυτοματοποιημένη πυκνομετρία και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του CB1R-EGFP ομαλοποιήθηκαν στα πρωτεϊνικά επίπεδα της ακτίνης (δεξιό πάνελ). (B) Απεικόνιση με GFP φθορισμό του κλώνου 3 της SH-SY5Y-CB1R σειράς που υπερεκφράζει σταθερά το CB1R. Όλα τα κύτταρα εκφράζουν σταθερά το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*EGFP*), και, συνεπώς, τον υποδοχέα. (Γ) Φθορισμός GFP (αριστερή εικόνα) και ανοσοκυταροχημική χρώση του υποδοχέα με αντίσωμα έναντι του CB1R και ακόλουθη σήμανση με κόκκινο φθορόχρωμα (δεξιά εικόνα) στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα κατέδειξαν έκφραση του CB1R-EGFP γονιδίου και του CB1 υποδοχέα, αντίστοιχα, στην πλασματική μεμβράνη. Το γονίδιο CB1R-EGFP και ο CB1R εκφράζονται γύρω από τους πυρήνες που επισημαίνονται με μπλε φθορόχρωμα (DAPI).

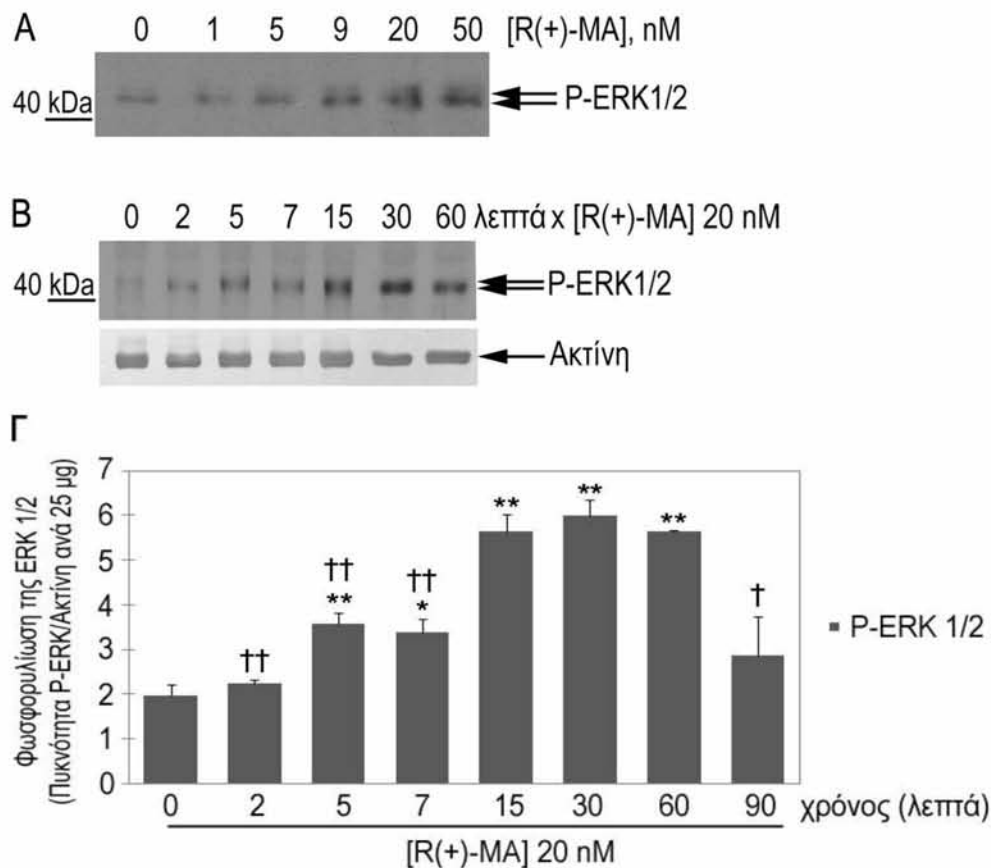


### 3.3. Ο CB1R ΕΠΑΓΕΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΜΕΣΩ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ $G_{q/11}/PLC/PKCε$ ΚΑΙ $G_i/SRC-FYN$ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

#### 3.3.1. Δοσοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση της ERK από τον CB1R και κορύφωση της ενεργοποίησής της σε δύο χρονικά σημεία σε φλοιϊκούς νευρώνες

Χορήγηση μεθανανδαμίδης, που στο εξής θα αναφέρεται σαν R(+)-MA, ενός σταθερού ανάλογου της ενδογενούς ανανδαμίδης και επιλεκτικού αγωνιστή του CB1 υποδοχέα, προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη (**Εικ.14Α**) και χρονοεξαρτώμενη (**Εικ.14Β**) ενεργοποίηση της ERK1/2 σε E7 πρωτογενείς νευρώνες. Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση μόλις 9 nM προκάλεσε έντονη ενεργοποίηση της ERK1/2 (**Εικ.14Α**). Η συγκέντρωση των 20 nM R(+)-MA επιλέχθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθούν όλα τα πειράματα, καθώς επάγει έντονη ενεργοποίηση της ERK εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα την ενεργοποίηση μόνο των CB1 υποδοχέων (Ki για CB1R: 20 nM ενώ για CB2R: 815 nM). Ειδικότερα, η επαγωγή της ενεργοποίησης της ERK πρωτοανιχνεύθηκε στα 2 λεπτά και συνέχισε να αυξάνεται μέχρι τα 5 λεπτά (πρώτη αύξηση ενεργοποίησης της ERK από R(+)-MA), όπου παρέμεινε σταθερή μέχρι να παρουσιάσει περαιτέρω άνοδο στα 15 λεπτά (δεύτερη αύξηση ενεργοποίησης της ERK από R(+)-MA). Τα επίπεδα ενεργοποίησης της ERK παρέμειναν υψηλά μέχρι τα 30 λεπτά, οπότε και άρχισαν να φθίνουν, πλησιάζοντας τα φυσιολογικά επίπεδα 90 λεπτά μετά τον ερεθισμό (**Εικ. 14Β και Γ**). Στατιστική ανάλυση αποκάλυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο διαδοχικές αυξήσεις της ενεργοποίησης της ERK που παρατηρήθηκαν στα 5 και 15 λεπτά μετά την έκθεση σε R(+)-MA (**Εικ. 14Γ**).

Αξίζει να σημειωθεί πως καμία άλλη ενεργοποίηση της ERK από το CB1R δεν ανιχνεύθηκε μέσα σε περίοδο 24 ωρών, κατά την οποία ωστόσο παρατηρήθηκε αύξηση στην επέκταση των νευραξόνων των νευρώνων. Όπως είδαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, αυτή η νευριτική ανάπτυξη εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική μετά από 48 ώρες επώασης με R(+)-MA, παρουσιάζοντας 37,5% αύξηση στο μήκος του κύριου νευρίτη εν συγκρίσει με τους νευρώνες που επωάστηκαν με μάρτυρα (**Εικ.12**).



**Εικόνα 14.** Η επαγόμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της ERK είναι δόσοεξαρτώμενη και η χρονική πορεία της φωσφορυλίωσής της αποκαλύπτει δύο διακριτές χρονικά φάσεις ενεργοποίησης. Τυπικά Western blots με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης ERK1 (άνω βέλος) και ERK2 (κάτω βέλος) μετά από επώαση των νευρώνων με (Α) διαφορετικές συγκεντρώσεις R(+)-MA για 15 λεπτά ή (Β) με 20 nM R(+)-MA για τις αναφερόμενες χρονικές περιόδους, και αφού οι ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες (25 μg ανά συνθήκη) διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE. Ο έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση ακτίνης (ΑΡ). (Γ) Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση της ενεργοποίησης της ERK από το CB1R, εκφραζόμενη ως ο λόγος της P-ERK πυκνότητας προς την πυκνότητα ακτίνης, και στατιστική ανάλυση. Οι στατιστικές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές που προέκυψαν από τις πυκνομετρικές αναλύσεις 5 πειραμάτων. Οι μπάρες ανταποκρίνονται στις μέσες τιμές  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e) 3-8 δειγμάτων. \* $P < 0.05$  και \*\* $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα (σημείο 0); † $P < 0.05$  και †† $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι 15 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

### 3.3.2. Ενεργοποίηση της ERK από τον CB1R μέσω nPKC και Src κινασών

Καθώς και οι  $G_{i/o}$  και οι  $G_{q/11}$  πρωτεΐνες συζεύγνυνται με το CB1 υποδοχέα και καθεμία από αυτές μπορεί να επάγει ενεργοποίηση της MAPK από GPCRs, το επόμενο βήμα ήταν να διερευνηθεί η συμμετοχή των υπομονάδων αυτών των G πρωτεϊνών στο CB1R-ERK μονοπάτι. Προκειμένου να εξεταστεί η συμμετοχή της

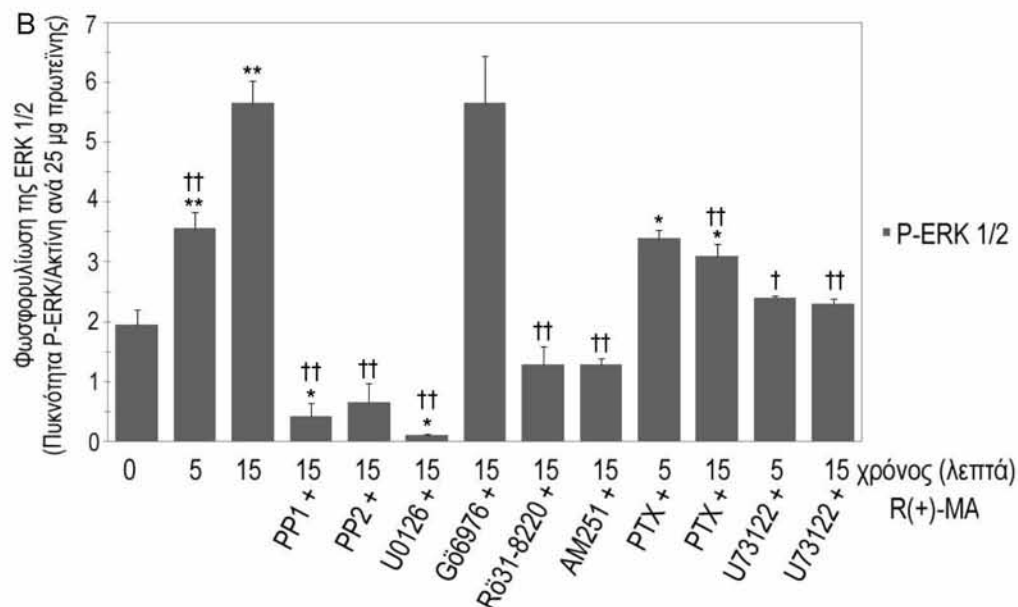
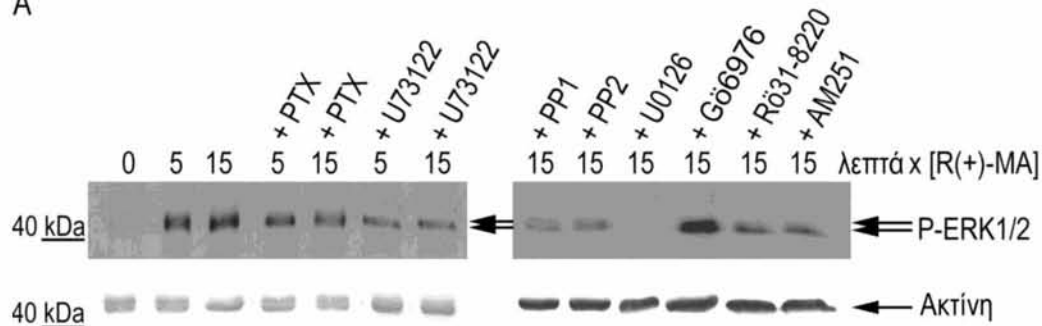


$G_{q/11}$  και η επακόλουθη ενεργοποίηση της PLC- $\beta$ , οι νευρώνες προεπώαστηκαν για 5 λεπτά με τον αναστολέα της PLC U73122 σε συγκέντρωση 3  $\mu\text{M}$ , συγκέντρωση η οποία δεν επιτρέπει απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από ενδοκυττάρια αποθήκες [147]. Ο U73122 κατέστειλε τόσο την πρώτη ενεργοποίηση της ERK από R(+)-MA στα 5 λεπτά όσο και τη δεύτερη στα 15 λεπτά, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από χορήγηση του δραστικού και επιλεκτικού ανταγωνιστή του CB1R AM251, ο οποίος σε συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$  εμπόδιζε την εξαρτώμενη από το CB1R ενεργοποίηση της ERK (**Εικ.15Α και Β**). Συνεπώς, ενεργοποίηση του CB1R με R(+)-MA προκάλεσε ενεργοποίηση της PLC, υδρόλυση της PI3K, και μέσω της αναπόφευκτης παραγωγής DAG, ενεργοποίηση της PKC που προηγείται αυτής της ERK. Για την περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω και την αναστολή της PKC, χρησιμοποιήθηκαν δύο παράγωγα σταυροσπορίνης, και συγκεκριμένα οι R $\delta$ 31-8220 και G $\delta$ 6976 αναστολείς (1  $\mu\text{M}$ ), οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά σε όλες τις εξαρτώμενες από  $\text{Ca}^{2+}$ , κλασσικές cPKC ισομορφές, με τη διαφορά ότι ο R $\delta$ 31-8220 αναστέλλει επιπλέον τις νεοφανείς nPKC ισομορφές [224,292]. Ο G $\delta$ 6976 αποδείχθηκε αναποτελεσματικός στην αναστολή της ενεργοποίησης της ERK από το CB1R, ενώ ο R $\delta$ 31-8220 ανέστειλε σημαντικά την ενεργοποίησή της, υποδηλώνοντας ότι nPKC και όχι cPKC ισομορφή μετέχει στο μονοπάτι CB1R-ERK (**Εικ.15Α και Β**).

Αντιθέτως, προεπώαση των νευρώνων για 16 ώρες με 200 ng/ml PTX που προάγει την ADP-ριβοζυλίωση των  $G_{\alpha_{i/o}}$  και, επομένως, παρεμποδίζει τη σύζευξή τους με τον ενεργοποιημένο CB1R, δεν προκάλεσε κάποια εμφανή αλλαγή στην πρώτη ενεργοποίηση της ERK στα 5 λεπτά, αλλά προκάλεσε σημαντική μείωση, κατά 50%, στη δεύτερη ενεργοποίηση της ERK από R(+)-MA που παρατηρείται στα 15 λεπτά (**Εικ.15Α και Β**). Ο προφανής ρόλος των  $G_{i/o}$  στη δεύτερη ενεργοποίηση της ERK από τον προσδεσμένο με αγωνιστή CB1 υποδοχέα, ανέδειξε την ανάμιξη μιας επιπλέον οδού μεταγωγής σήματος στην ενεργοποίηση της ERK από κανναβινοειδή, πιθανότατα την ενεργοποίηση μιας κινάσης τυροσίνης [184]. Κατά συνέπεια, στη συνέχεια διερευνήθηκε ο δυνητικός ρόλος δύο μελών της οικογένειας Src κυτοπλασματικών κινασών τυροσίνης στην πρώιμη σηματοδότηση του CB1R, και συγκεκριμένα της Src και της Fyn, οι οποίες αποτελούν τις πρωταρχικές κινάσες τυροσίνης στους E7 νευρώνες [206] με γνωστό λειτουργικό πλεονασμό. Οι επιλεκτικοί για τη Src και τη Fyn αναστολείς PP1 και PP2 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  και 20 $\mu\text{M}$  αντίστοιχα, κατήργησαν την επαγόμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της ERK τόσο σημαντικά, ώστε τα επίπεδά της να πλησιάζουν σχεδόν αυτά που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση του U0126, επιλεκτικού αναστολέα της MEK1/2

κινάσης που προηγείται αμέσως της ενεργοποίησης της ERK (*Εικ.15Α και Β*). Συνολικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι μία νεοφανής, ανεξάρτητη από  $\text{Ca}^{2+}$  PKC ισομορφή, καθώς και μέλη της οικογένειας Src κινασών τυροσίνης, μεσολαβούν στην παρατηρούμενη ενεργοποίηση της ERK από το CB1R.

A



**Εικόνα 15.** Η επαγόμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της ERK προϋποθέτει ενεργοποίηση των  $G_{q/11}$  (PLC/PKC) και  $G_i$  (Src, Fyn) σε πρωτογενείς νευρώνες. (A) Οι νευρώνες επωάστηκαν με μάρτυρα ή με 20 nM R(+)-MA για τις αναφερόμενες χρονικές περιόδους, απουσία ή παρουσία 200 ng/ml PTX ή 3  $\mu\text{M}$  U73122 (αριστερό πάνελ) ή 10  $\mu\text{M}$  PP1, 20  $\mu\text{M}$  PP2, 10  $\mu\text{M}$  U0126, 1  $\mu\text{M}$  Gö6976, 1  $\mu\text{M}$  R631-8220 ή 5  $\mu\text{M}$  AM251 (δεξιό πάνελ). Το Western blotting για τις φωσφορυλιωμένες μορφές της ERK έγινε όπως προηγουμένως, και ο έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση ακτίνης (AP αριστερά ή ECL δεξιά). (B) Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK, εκφραζόμενη ως ο λόγος της P-ERK πυκνότητας προς την πυκνότητα ακτίνης, και στατιστική ανάλυση. Οι στατιστικές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές που προέκυψαν από τις πυκνομετρικές αναλύσεις 5 πειραμάτων. Οι μπάρες ανταποκρίνονται στις μέσες τιμές  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e) 3-8 δειγμάτων. \* $P < 0.05$  και \*\* $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα (σημείο 0); † $P < 0.05$  έναντι 5 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA; †† $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι 15 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

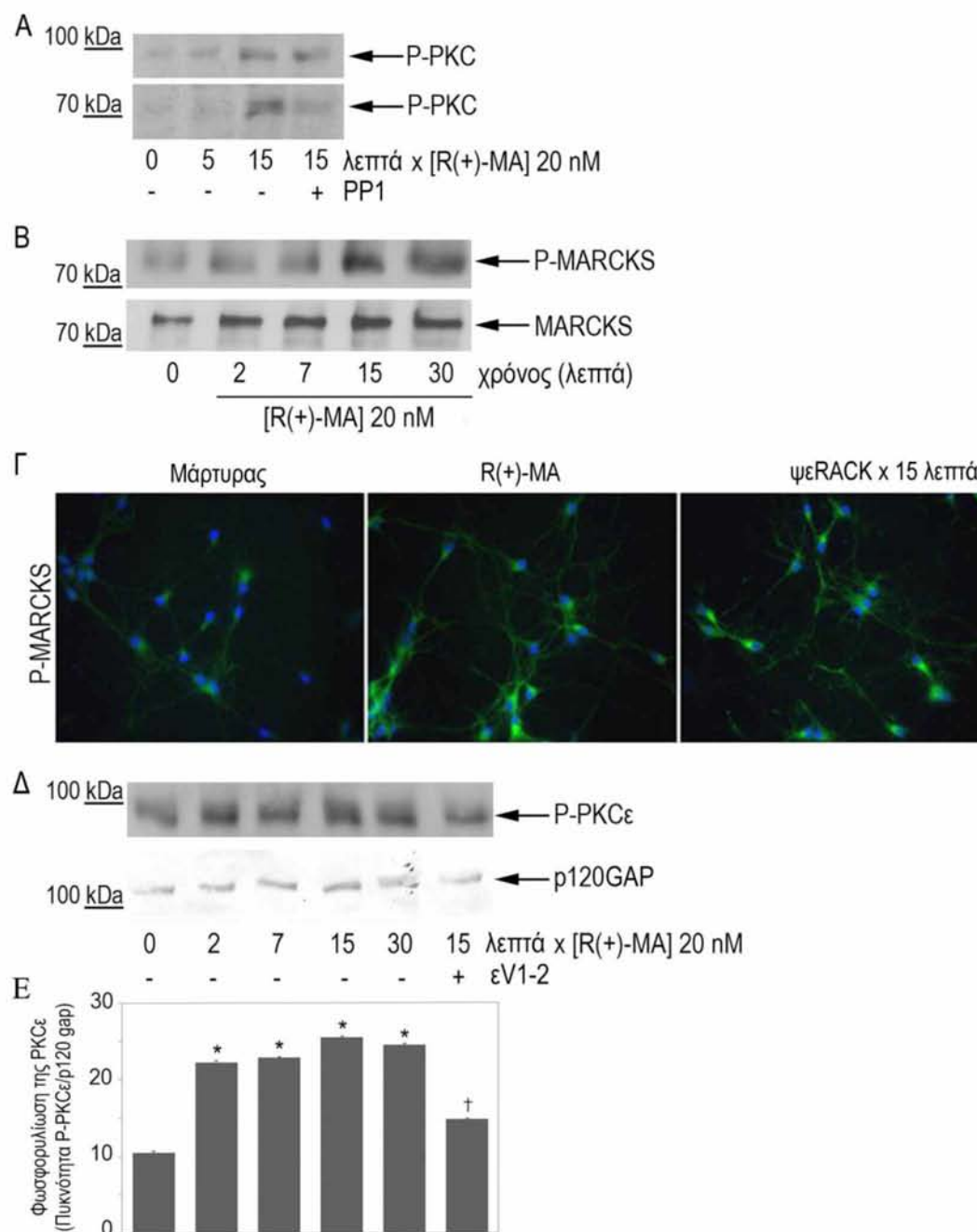


### 3.3.3. Ενεργοποίηση της PKCε από τον CB1R άνωθεν των Src και Fyn

Τα επόμενα πειράματά μας εστιάστηκαν στον καθορισμό της συγκεκριμένης νεοφανούς PKC ισομορφής που μετέχει στο μονοπάτι CB1R-ERK, και για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η ενεργοποίηση όλων των PKC από R(+)-MA, χρησιμοποιώντας ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες/ενεργοποιημένες μορφές όλων των PKC. Ανάλυση των πρωτεϊνών E7CH νευρώνων μετά από έκθεση σε 20 nM R(+)-MA μέσω ανοσοαποτύπωσης, αποκάλυψε δύο ζώνες φωσφορυλίωσης, μοριακού μεγέθους 92 και 70 kDa. Η φωσφορυλίωση της μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους PKC ανιχνεύθηκε σχεδόν αμέσως (σε λιγότερο από ένα λεπτό), εμφάνισε περίπου 3 φορές αύξηση μετά από έκθεση σε R(+)-MA για 5 λεπτά, και παρουσίασε κορύφωση στα 15 λεπτά, ενώ η φωσφορυλίωση της 70 kDa PKC ανιχνεύθηκε μονάχα μετά από μεγαλύτερης διάρκειας ερεθισμό (>10 λεπτά) με R(+)-MA (**Εικ.16Α**). Παράλληλα, ο επιλεκτικός για τις Src κινάσες αναστολέας PP1 που δείχθηκε προηγουμένως να αναστέλλει την ενεργοποίηση της ERK από R(+)-MA, ανέστειλε την ενεργοποίηση της 70 kDa PKC, αλλά όχι της άμεσα ενεργοποιούμενης ~92 kDa PKC, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση της τελευταίας πιθανά προηγείται των Src κινάσων (**Εικ.16Α**). Κατά αναλογία με τη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση των PKC, η MARCKS, κύριο ειδικό υπόστρωμα της PKC, βρέθηκε επίσης να φωσφορυλιώνεται κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο, και το χρονικό προφίλ αυτής της φωσφορυλίωσης να αντικατοπτρίζει αυτό της 92 kDa PKC, ξεκινώντας στα 2 λεπτά χορήγησης R(+)-MA και φτάνοντας στα μέγιστα επίπεδα στα 15 λεπτά (**Εικ.16Β**). Ενεργοποίηση της MARCKS από το CB1R ανιχνεύθηκε, επίσης, μέσω ανοσοκυτταροχημικής ανάλυσης και σήμανσης με πράσινο φθορόχρωμα, όπου παρατηρήθηκε έντονη αύξηση του φθορισμού στους νευρώνες που επωάστηκαν για 15 λεπτά με R(+)-MA σε σχέση με τους νευρώνες που επωάστηκαν με μάρτυρα (**Εικ.16Γ**). Σημαντικότερα, η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση της MARCKS, και συνεπώς η αύξηση της έντασης του φθορισμού, ήταν ανάλογη με αυτή που προκλήθηκε από την απευθείας ενεργοποίηση της νεοφανούς PKCε με τον ειδικό πεπτιδικό ενεργοποιητή της ψεRACK [289] (**Εικ.16Γ**).

Το μοριακό βάρος της άμεσα ενεργοποιούμενης PKC (~92 kDa), σε συνδυασμό με τα μέχρι τώρα δεδομένα, ανταποκρίνεται στη νεοφανή PKCε που αποτελεί τη μεγαλύτερη σε αφθονία PKC ισομορφή στους νευρώνες τελεγκεφάλου νεοσσού όρνιθας. Προκειμένου να επιδειχθεί πλήρως η εξαρτώμενη από κανναβινοειδή ενεργοποίηση της PKCε, αναλύθηκε η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωσή της, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης PKCε. Τα δεδομένα της **Εικόνας 16Δ και Ε** δείχνουν ότι η R(+)-MA προκάλεσε χρονοεξαρτώμενη

φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της PKCε, η οποία πρωτοανιχνεύθηκε μόλις στα 2 λεπτά και, όπως ήταν αναμενόμενο, αναστάλθηκε από τον ειδικό για την PKCε πεπτιδικό αναστολέα εV1-2 [289], υποστηρίζοντας περαιτέρω την υπόθεση ότι η PKCε είναι η νεοφανής PKC που μεσολαβεί στην εξαρτώμενη από CB1R ενεργοποίηση της ERK.

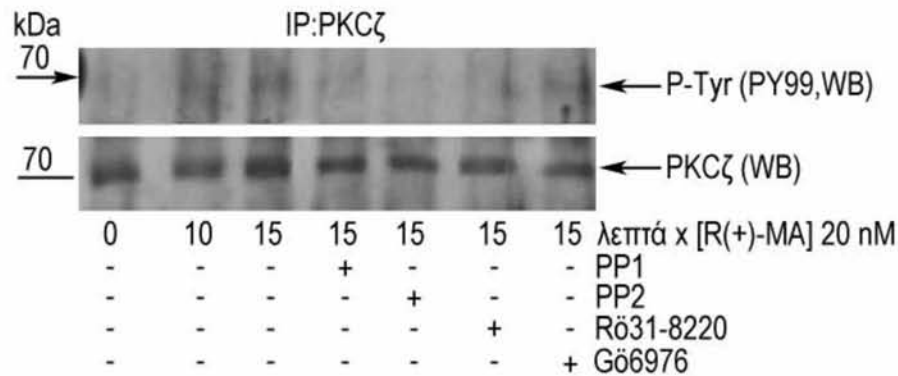


**Εικόνα 16.** Η R(+)-MA επάγει οξεία φωσφορυλίωση της PKCε και MARCKS. (A) Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της PKC με ειδικό για τις φωσφορυλιωμένες μορφές όλων των PKC αντίσωμα, αποκαλύπτει δύο PKC ισομορφές στις περιοχές 92 kDa και 70 kDa που διεγείρονται από R(+)-MA; Προεπώαση με PP1 (10 μM) αναστέλλει την ενεργοποίηση της 70 kDa,



αλλά όχι της 100 kDa PKC. (B) Επαγόμενη από R(+)-MA χρονοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση της MARCKS μετά από ανάλυση με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης MARCKS (άνω πάνελ) και της ολικής MARCKS για εκτίμηση της προκαλούμενης από αγωνιστή τροποποίησης (κάτω πάνελ). (Γ) Ανίχνευση της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της MARCKS από το CB1R μέσω ανοσοκυταροχημικής ανάλυσης. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της P-MARCKS και ακόλουθη σήμανση με πράσινο φθορόχρωμα (FITC) σε φλοιικούς νευρώνες που επωάστηκαν με R(+)-MA (20 nM) ή ψεRACK (1μM) για 15 λεπτά αποκάλυψε αυξημένη ένταση φθορισμού σε σχέση με τους νευρώνες που επωάστηκαν με μάρτυρα. (Δ) Αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης PKCε αποκάλυπτει οξεία φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της PKCε, καταστέλλόμενη από παρουσία 1 μM ειδικού PKCε πεπτιδικού αναστολέα εV1-2. Έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση της Ras GTPase, p120GAP. (Ε) Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση της εξαρτώμενης από το CB1R φωσφορυλίωσης της PKCε εκφραζόμενη ως ο λόγος της πυκνότητας P-PKCε/p120gap στα 25 μg πρωτεΐνης. Οι μπάρες ανταποκρίνονται στις μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e) τριών διαφορετικών πειραμάτων. \*  $P < 0.05$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα (σημείο 0); †  $P < 0.05$  έναντι 15 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA (Asimaki and Mangoura, *Neurochem Int* 2011) [291].

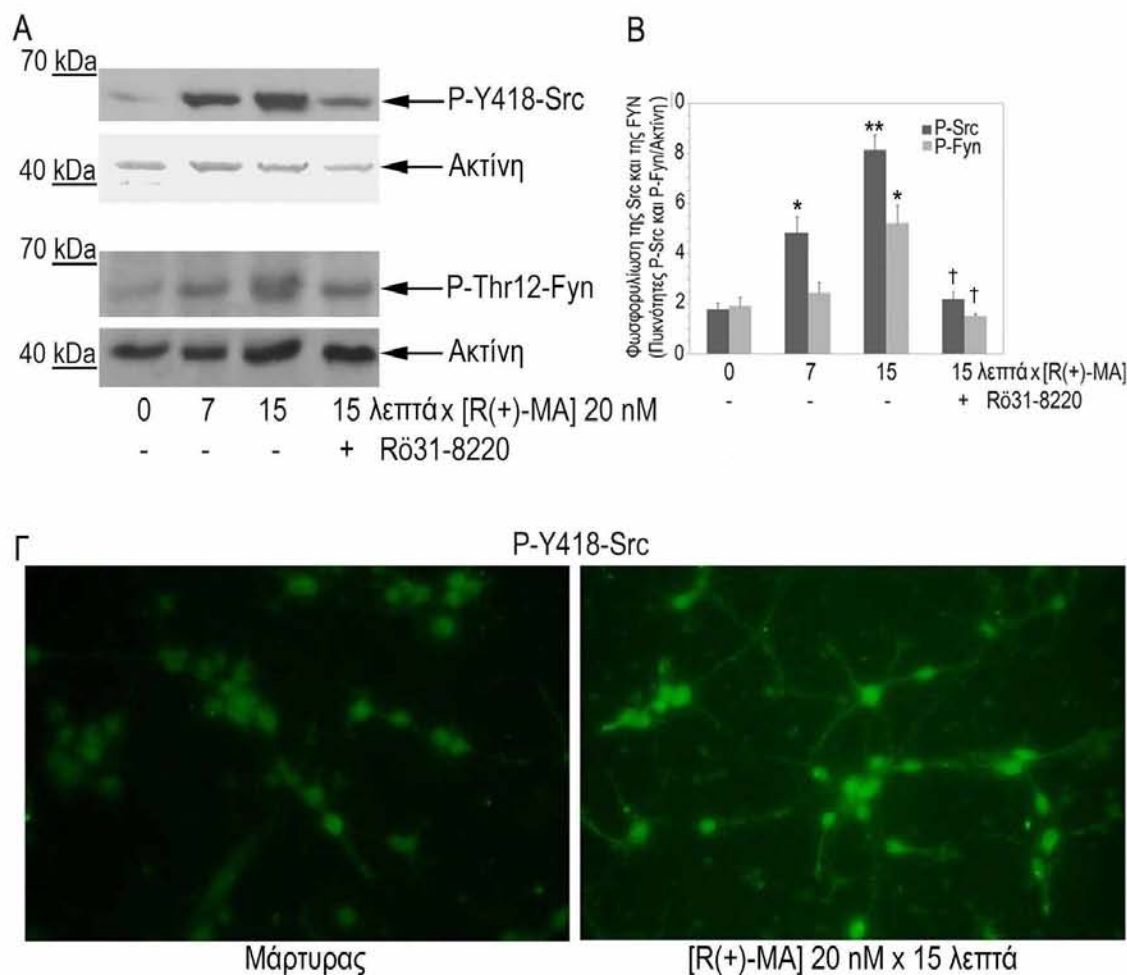
Από την άλλη, το μοριακό βάρος (~70 kDa) της δεύτερης PKC ισομορφής που ανιχνεύθηκε να αποκρίνεται σε R(+)-MA, συνάδει με πολλές PKC ισομορφές. Καθώς, όμως, οι E7CH νευρώνες έχουν βρεθεί να εκφράζουν, πέραν της έψιλον, μόνο τις άλφα, βήτα και ζήτα PKC ισομορφές [259], και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας που απέκλεισαν την ενδεχόμενη συμμετοχή κάποιας cPKC στο μονοπάτι CB1R-ERK (**Εικ.15Α και Β**), είναι εύλογο να υποτεθεί ότι η aPKCζ είναι η 70 kDa ισομορφή της οποίας η ενεργοποίηση πιθανά έπεται της ενεργοποίησης της οικογένειας των Src κινασών. Πράγματι, ανάλυση της φωσφορυλίωσης της PKCζ, όπως προέκυψε από ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) με PKCζ αντίσωμα και ανοσοαποτύπωση όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα PY99 που αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, αποκάλυψε αυξημένη ενεργοποίησή της μετά από έκθεση σε R(+)-MA για 10 και 15 λεπτά (**Εικ.17**). Σημαντικότερα, η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση της PKCζ βρέθηκε να αναστέλλεται από PP1, PP2 και R531-8220 αναστολείς, αλλά όχι από Gö6976 (**Εικ.17**), ενισχύοντας την υπόθεση ότι η PKCζ ισομορφή είναι η δεύτερη PKC που ενεργοποιείται επιπλέον της PKCε και ευρίσκεται καθοδικά (downstream) της hPKCε και των Src κινασών στο μονοπάτι του CB1R. Ωστόσο, καθώς δεν υπάρχουν αποτελέσματα που να συνδέουν άμεσα την PKCζ με την ενεργοποίηση της ERK από το CB1R, όπως στην περίπτωση της PKCε που η αναστολή της καταργεί την ενεργοποίηση της ERK, παραμένει άγνωστος ο ρόλος της PKCζ στη σηματοδότηση του CB1R.



**Εικόνα 17.** Η PKCζ φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη από R(+)-MA (20 nM) κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη nPKCε και τις Src κινάσες σε πρωτογενείς νευρώνες, όπως καταδεικνύει ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της κατακρημνισμένης (IP) PKCζ με το ειδικό για φωσφορυλίωση σε τυροσίνη αντίσωμα PY99 (άνω πάνελ) και με PKCζ αντίσωμα (κάτω πάνελ) για εκτίμηση των επιπέδων της κατακρημνισμένης PKCζ. Ανάλογα με τη συνθήκη, έχει προηγηθεί ή όχι της χορήγησης αγωνιστή, επώαση των νευρώνων για 20 λεπτά με τους αναστολείς των Src κινασών PP1 (10 μM) και PP2 (20 μM) ή με τον αναστολέα των νεοφανών και κλασσικών PKC ισομορφών Rö31-8220 (1 μM) ή με τον αναστολέα των κλασσικών PKC ισομορφών Gö6976 (1 μM).

Ως συνέχεια του ευρήματος ότι η επαγόμενη από CB1R φωσφορυλίωση της ERK και της PKCζ εμποδίζεται από τους PP1 και PP2 αναστολείς των Src και Fyn κινασών τυροσίνης (**Εικ.15A και B**), διερευνήθηκε η ενεργοποίηση της καθεμίας σε απόκριση στο R(+)-MA. Αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης κατέδειξαν ότι ερεθισμός με R(+)-MA προκάλεσε, κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο, φωσφορυλίωση και, επομένως, ενεργοποίηση τόσο της Src όσο και της Fyn, η οποία ανιχνεύθηκε αμέσως, παρουσίασε άνοδο στα 15 λεπτά και μειώθηκε μετέπειτα (**Εικ.18A και B**). Σημαντικότερα, η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της Src και της Fyn κατεστάλη σημαντικά από τον Rö31-8220 αναστολέα των νεοφανών και κλασσικών PKC ισομορφών (**Εικ.18A και B**), υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση της PKCε προηγείται της ενεργοποίησης των Src κινασών Src και Fyn. Ενεργοποίηση της Src από το CB1R ανιχνεύθηκε, επίσης, μέσω ανοσοκυταροχημικής ανάλυσης και σήμανσης με πράσινο φθορόχρωμα, όπου παρατηρήθηκε έντονη αύξηση του φθορισμού στους νευρώνες που επωάστηκαν για 15 λεπτά με R(+)-MA (**Εικ.18Γ**).

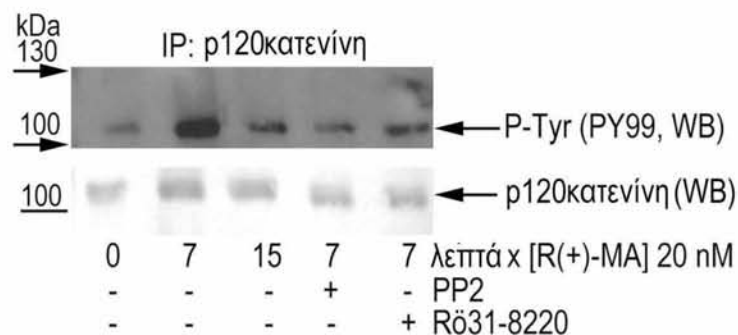




**Εικόνα 18.** Ο CB1R ενεργοποιεί τις Src και Fyn κινάσες τυροσίνης. (Α) Ανιχνεύθηκε φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση των Src και Fyn μετά από έκθεση σε R(+)-MA όπως υποδεικνύει ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης Src (PY418) και της φωσφορυλιωμένης Fyn (Thr12); Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση ακτίνης. (Β) Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση της φωσφορυλιωμένης Src και Fyn από R(+)-MA, εκφραζόμενη ως ο λόγος της πυκνότητας P-Src/ακτίνη και P-Fyn/ακτίνη στα 25 μg πρωτεΐνης. Οι μπάρες ανταποκρίνονται στις μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e) τριών διαφορετικών πειραμάτων. \*  $P < 0.05$  και \*\*  $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα (σημείο 0); †  $P < 0.01$  έναντι 15 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA. (Γ) Ανίχνευση της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της Src από το CB1R μέσω ανοσοκυταροχημικής ανάλυσης. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της P-Src και ακόλουθη σήμανση με πράσινο φθορόχρωμα (FITC) σε φλοιϊκούς νευρώνες που επωάστηκαν με R(+)-MA (20 nM) για 15 λεπτά αποκάλυψε αυξημένη ένταση φθορισμού σε σχέση με τους νευρώνες που επωάστηκαν με μάρτυρα (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

Η λειτουργική ενεργοποίηση της Src από το CB1R σε E7CH νευρώνες διαπιστώθηκε περαιτέρω, όταν το γνωστό και ειδικό υπόστρωμα της Src, p120κατενίνη (catenin), ανιχνεύθηκε ότι φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη μετά από έκθεση σε R(+)-MA.

Χαρακτηριστικά, η R(+)-MA βρέθηκε να επάγει τυροσινική φωσφορυλίωση της p120κατενίνης που παρουσίασε εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα στα 7 λεπτά τα οποία επίπεδα μειώθηκαν στα 15 λεπτά, όπως κατέδειξε ανοσοαποτύπωση της κατακρημνισμένης p120 μετά από ανάλυση με PY99 (**Εικ.19, άνω πάνελ**). Επιπλέον ανάλυση της κατακρημνισμένης p120 με αντίσωμα έναντι της ολικής p120 για έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων, επίσης, αποκάλυψε το σημαντικό βαθμό της φωσφορυλίωσης της p120 σε απόκριση στο CB1R αγωνισμό (agonism). Συγκεκριμένα, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της p120 πρωτεΐνης εμφάνισε σαφή επιβράδυνση, η οποία προκλήθηκε από την αύξηση του μοριακού της βάρους εξαιτίας της αυξημένης φωσφορυλίωσης που παρατηρήθηκε στα 7 λεπτά (**Εικ.19, κάτω πάνελ**). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι PP2 και Rō31-8220 αναστολείς των Src και PKC κινασών αντίστοιχα, κατήργησαν τη δραστική τροποποίηση της p120.

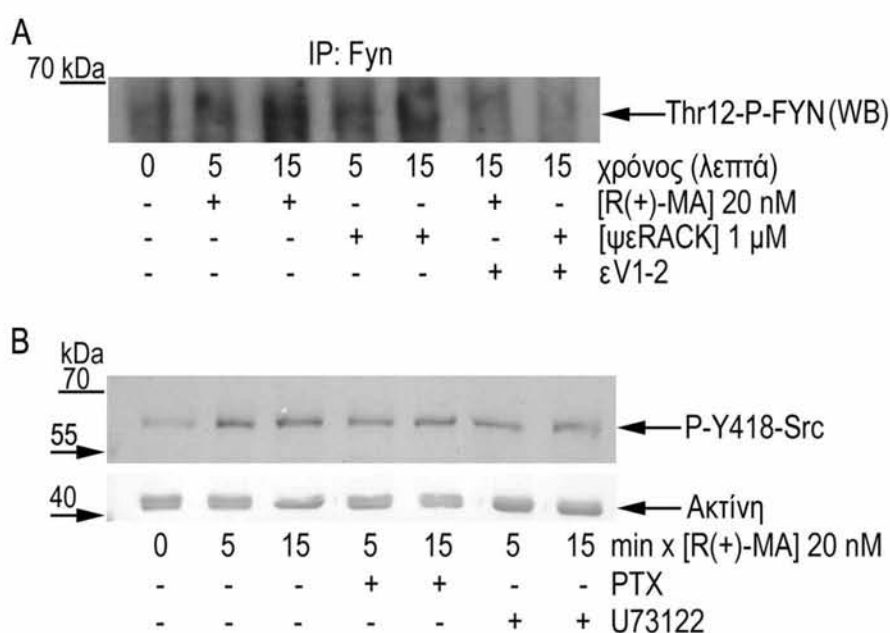


**Εικόνα 19.** Ο CB1R ενεργοποιεί το ειδικό υπόστρωμα της Src p120κατενίνη σε πρωτογενείς νευρώνες. Η p120κατενίνη φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη από R(+)-MA, όπως καταδεικνύει ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της κατακρημνισμένης p120 με το αντίσωμα PY99 (άνω πάνελ) και με ειδικό για τη p120 αντίσωμα (κάτω πάνελ) για εκτίμηση των επιπέδων της κατακρημνισμένης p120. Ανάλογα με τη συνθήκη, έχει προηγηθεί ή όχι της χορήγησης αγωνιστή, επώαση των νευρώνων για 20 λεπτά με τον PP2 (20 μM) ή Rō31-8220 (1 μM) αναστολέα (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

Τα επόμενα πειράματα στράφηκαν στην περαιτέρω διερεύνηση της έκδηλης αυτής εξάρτησης της ενεργοποίησης των κινασών τυροσίνης από την προγενέστερη ενεργοποίηση της PKCε. Αρχικά, εξετάστηκε η φωσφορυλίωση της Fyn στη θρεονίνη 12 (Thr12), μία τροποποίηση σε περιοχή της PKC που θεωρείται πως συνδέεται με την ενεργοποίηση της Fyn [293]. Ανοσοκατακρήμνιση της Fyn και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα ειδικό για την ανίχνευση της φωσφορυλίωσης της Fyn στη Thr12 (Thr12-p-Fyn) αποκάλυψε στα 5 λεπτά σημαντικά υψηλή φωσφορυλίωση της Fyn από R(+)-MA ή από τον ειδικό πεπτιδικό ενεργοποιητή της PKCε ψεRACK, η οποία έφτασε στο μέγιστο 15 λεπτά μετά την έκθεση στον αγωνιστή (**Εικ.20Α**). Ο



επιλεκτικός για την PKCε πεπτιδικός αναστολέας εV1-2 προκάλεσε σημαντική μείωση της επαγόμενης από R(+)-MA φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της Fyn (**Εικ.20Α**). Επιπροσθέτως, αναστολή της PLC (και συνεπώς της PKCε) με U73122 και των  $G_{i/o}$  με PTX ανέστειλαν με διαφορετικό τρόπο τη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της Src από R(+)-MA (**Εικ.20Β**). Συγκεκριμένα, ο U73122 ανέστειλε σημαντικά την ενεργοποίηση της Src κατά 55-70%, ενώ το PTX άσκησε μία μείωση της τάξης 18-25% και στους δύο χρόνους έκθεσης σε R(+)-MA, υποδηλώνοντας ότι, παρόλο που και οι  $G_q$  και  $G_{i/o}$  πρωτεΐνες G συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της Src, ωστόσο, αναστολή των  $G_q$  προλαμβάνει σε μεγαλύτερο βαθμό την εξαρτώμενη από  $G_{i/o}$  ενεργοποίηση της Src. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, η πειραματική αυτή προσέγγιση παρέχει σαφείς ενδείξεις για μία χρονική αλληλουχία, όπου, μετά από ερεθισμό του CB1 υποδοχέα, η ενεργοποίηση της PKCε προηγείται της ενεργοποίησης των Src και Fyn κινάσων τυροσίνης σε μία σειρά στενά συνδεδεμένων σηματοδοτικών γεγονότων που οδηγούν σε επαγωγή της φωσφορυλίωσης ειδικών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

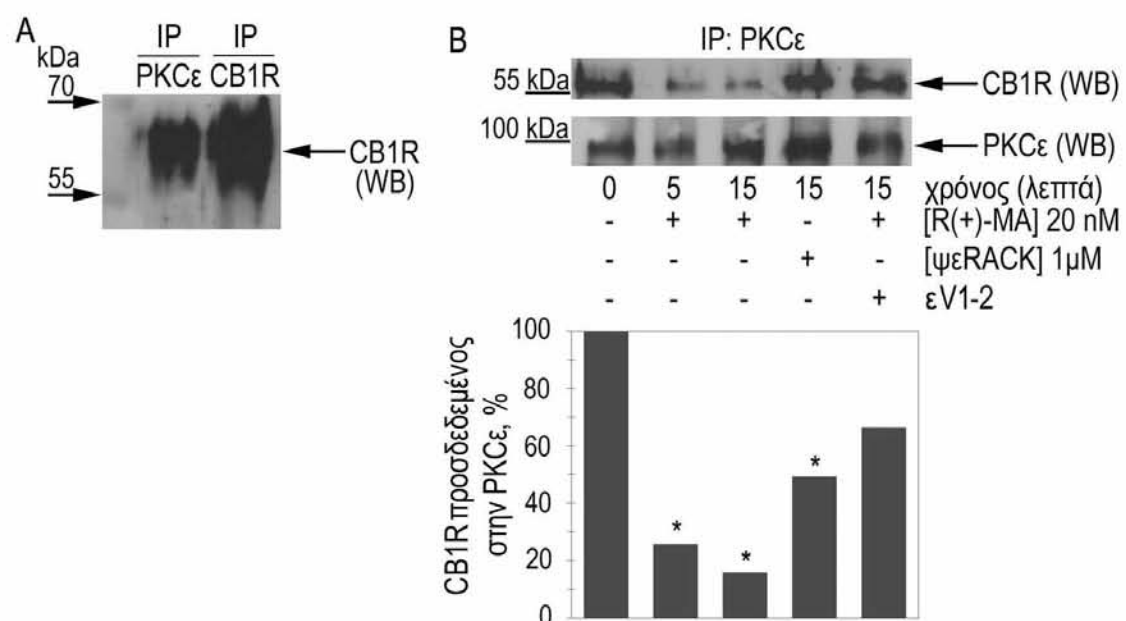


**Εικόνα 20.** Οι Src και Fyn κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται σε πρωτογενείς νευρώνες από το CB1R καθοδικά της PKCε μέσω  $G_q$  και  $G_{i/o}$  πρωτεϊνών. (Α) Η φωσφορυλίωση της Fyn εξαρτάται από την προγενέστερη ενεργοποίηση της PKCε από R(+)-MA ή ψεRACK, όπως καταδεικνύει ανάλυση της ανοσοκατακρημνισμένης (IP) Fyn με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης Fyn (Thr12-P-Fyn); ο πεπτιδικός αναστολέας της PKCε εV1-2 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της Fyn. (Β) Η εξαρτώμενη από το CB1R ενεργοποίηση της Src μεσολαβείται από  $G_q$ /PLC και  $G_{i/o}$ , όπως αποκάλυψε ανάλυση με ανοσοαποτύπωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Src (PY418), παρουσία ή απουσία των αντίστοιχων αναστολέων U73122 και PTX (Asimaki and Mangoura, *Neurochem Int* 2011) [291].

### 3.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ CB1R-PKCε ΚΑΙ PKCε-Src/Fyn ΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ CB1R ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

#### 3.4.1. (Προ)σύνδεση του CB1R με τη ρυθμιστική περιοχή της PKCε και αποσύνδεση μετά από πρόσδεση αγωνιστή

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο CB1 υποδοχέας ενεργοποιεί διαδοχικά την PKCε και τις Src/Fyn, μελετήθηκαν οι ενδεχόμενες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των εν λόγω πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation). Στην πρώτη σειρά των πειραμάτων βρέθηκε ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, χωρίς δηλαδή καμία δραστηριότητα από εξωγενείς παράγοντες, περισσότερο από το 50% των CB1R μορίων συνδέονται με την PKCε (**Εικ.21Α**). Ερεθισμός με τον R(+)-MA αγωνιστή του CB1R προκάλεσε εξαιρετική μείωση της ποσότητας του ανοσοκατακρημνισμένου με την PKCε υποδοχέα σε σχέση με τον ερεθισμό με τον PKCε ενεργοποιητή ψεRACK, υποδηλώνοντας πως μόνο ο προσδεδεδμένος με αγωνιστή CB1R έχει την ικανότητα αποσύνδεσης από την ενεργοποιημένη PKCε (**Εικ.21Β**). Επιπλέον, 1  $\mu$ M του ειδικού για την PKCε πεπτιδικού αναστολέα εV1-2 ανέστειλε την επαγόμενη από R(+)-MA CB1R-PKCε αποσύνδεση (**Εικ.21Β**), πιθανά αντανakλώντας και την ενεργοποίηση της PKCε ως προϋπόθεση για την αποσύνδεση αυτή.

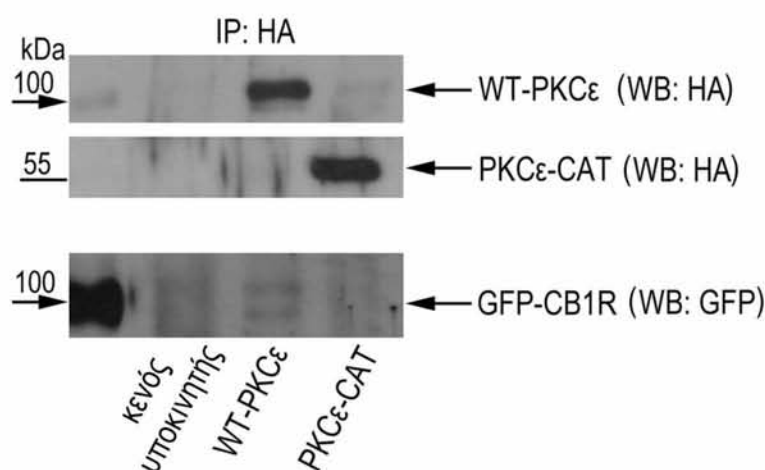


**Εικόνα 21.** Σύνδεση του CB1R με την PKCε σε πρωτογενείς νευρώνες και αποσύνδεσή τους μετά από πρόσδεση R(+)-MA. (Α) Η ποσότητα του CB1R που συν-ανοσοκατακρημνίζεται με το



μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα έναντι της PKCε (1μg IgG για 500 μg ολικής πρωτεΐνης) (αριστερή λωρίδα), ανέρχεται περίπου στη μισή από αυτή που ανακτάται με ειδικό για το CB1R αντίσωμα (δεξιά λωρίδα) σε παρθένους (naïve) νευρώνες. (B) Μετά από ερεθισμό με R(+)-MA ή ψεRACK, η ποσότητα του CB1R (άνω πάνελ) που συν-ανοσοκατακρημνίζεται με την PKCε (κάτω πάνελ) μειώθηκε σημαντικά, όπως φαίνεται από την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης και την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση. Οι μπάρες αντιστοιχούν στα ποσοστά επί τοις % του προσδεδμένου στην PKCε CB1R στις διάφορες συνθήκες, σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες που θεωρείται πως υπάρχει 100% σύνδεση των CB1R-PKCε. \*  $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των φυσιολογικών συνθηκών (χρόνος 0) (Asimaki and Mangoura, *Neurochem Int* 2011) [291].

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε HEK-293 επιθηλιακά κύτταρα, στα οποία υπερεκφράστηκε ο επισημασμένος με GFP CB1R μετά από παροδική συν-διαμόλυνση με πλασμίδια PKCε αγρίου τύπου (WT-PKCε) ή με την καταλυτική περιοχή της PKCε (PKCε-CAT) επισημασμένα με HA. Συγκεκριμένα, η ικανότητα του CB1R να σχηματίζει σύμπλοκα με την PKCε επαληθεύθηκε περαιτέρω μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PKCε από τα παραπάνω κυτταρικά εκχυλίσματα με αντισώματα έναντι στο HA, και, ακόλουθη ανάλυση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση της ανοσοαντίδρασης του CB1R με αντισώματα έναντι του GFP (**Εικ.22**). Ωστόσο, παρόλο που η WT-PKCε βρέθηκε να συνδέεται με το CB1R, καμία αλληλεπίδραση δεν ανιχνεύθηκε ανάμεσα στο CB1R και στην καταλυτική περιοχή της PKCε (**Εικ.22**), υποδεικνύοντας ότι, στην αλληλεπίδραση μεταξύ CB1R και PKCε σε φυσιολογικές συνθήκες, μεσολαβεί η ρυθμιστική περιοχή της PKCε.



**Εικόνα 22.** Σύνδεση της αγρίου τύπου PKCε (WT-PKCε), αλλά όχι της καταλυτικής περιοχής της (PKCε-CAT) με το CB1R, σε HEK293 κύτταρα συν-διαμολυσμένα με 3 μg GFP-CB1R πλασμίδιο και 3 μg WT-PKCε, PKCε-CAT, ή με κενά πλασμίδια ως μάρτυρα. Τα άνω πάνελ απεικονίζουν την ειδικότητα

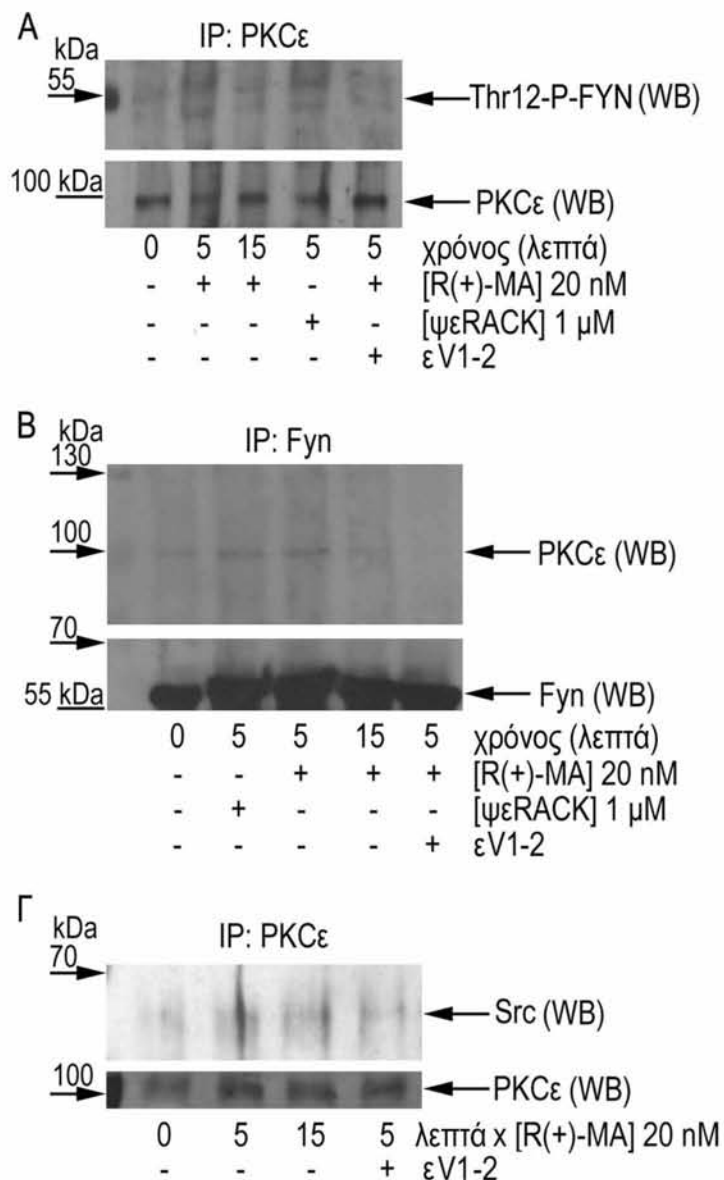
και τα μεγέθη των ανοσοκατακρημνισμένων WT-PKCε και PKCε-CAT, ενώ το κάτω αποκαλύπτει την ανοσοαντίδραση του CB1R, όπως ανιχνεύθηκε από τον GFP επισημαντή, στα WT-PKCε ανοσοσύμπλοκα, αλλά όχι στα PKCε-CAT (Asimaki and Mangoura, Neurochem Int 2011) [291].

### 3.4.2. Σύνδεση της ενεργοποιημένης PKCε με τις Src και Fyn

Στην προσπάθεια να αναλυθούν διεξοδικότερα η αλληλουχία και η φύση των πρώιμων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών μετά από ερεθισμό του CB1R, και καθώς η PKCε έχει δείχθει να συνδέεται φυσικά με τη Src [294], μελετήθηκε η ενδεχόμενη σύνδεση της ενεργοποιούμενης από το CB1R PKCε με τις Src ή Fyn κινάσες, χρησιμοποιώντας συν-ανοσοκατακρημνίσεις και ανίχνευση των συμπλόκων με σχετικά αντισώματα (**Εικ.23**). Ερεθισμός του CB1R με R(+)-MA σε πρωτογενείς νευρώνες, προκάλεσε αξιοσημείωτη αύξηση της σύνδεσης της ενεργοποιημένης PKCε με τις επίσης ενεργοποιημένες τυροσινικές κινάσες Src και Fyn, σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που προκαλούνται από απευθείας ενεργοποίηση της PKCε με ψεRACK. Συγκεκριμένα, ανοσοκατακρήμνιση της PKCε αποκάλυψε παροδική αλληλεπίδρασή της με τη φωσφορυλιωμένη Fyn μετά από ερεθισμό με R(+)-MA ή ψεRACK για 5 λεπτά, ενώ η αλληλεπίδραση PKCε-Fyn παρεμποδίστηκε από τον πεπτιδικό αναστολέα της PKCε εV1-2 (**Εικ.23Α**). Αντιστοίχως, η κατακρημνισμένη Fyn περιείχε σημαντικά αυξημένη ποσότητα της PKCε μετά από έκθεση σε R(+)-MA ή ψεRACK για 5 λεπτά, και η σύνδεση των ενεργοποιημένων κινασών αναστάλθηκε εντελώς όταν προηγήθηκε επώαση με τον εV1-2 αναστολέα (**Εικ.23Β**). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν όταν και η Src ανιχνεύθηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση της PKCε (**Εικ.23Γ**), μολονότι η σύνδεση της PKCε με τη Src διήρκεσε περισσότερο, ξεπερνώντας τα 15 λεπτά, σε σύγκριση με τη σύνδεση της PKCε με τη Fyn που ήταν ισχυρότερη στα 5 λεπτά επώασης με R(+)-MA. Σημαντικότερα, η σύνδεση PKCε και Src βρέθηκε, επίσης, να εξαρτάται από τη δραστικότητα της PKCε, καθώς καταργήθηκε από τον εV1-2 (**Εικ.23Γ**).

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι, σε νευρωνικό επίπεδο, ο CB1 υποδοχέας βρίσκεται συνδεδεμένος με την PKCε μέχρι να επέλθει ενεργοποίησή του, οπότε και αποσυνδέεται από την PKCε, ώστε η τελευταία να αλληλεπιδράσει με τις Src και Fyn κινάσες τυροσίνης και μέσω του σχηματισμού PKCε-Src/Fyn συμπλόκων να επάγει την ενεργοποίησή τους. Έτσι, εγκαθίσταται μια οδός μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται από το CB1 υποδοχέα και επάγει ενεργοποίηση της ERK.





**Εικόνα 23.** Η ενεργοποιούμενη από R(+)-MA PKCε συνδέεται με τις Src και Fyn κινάσες τυροσίνης. (Α) Οι νευρώνες επωάστηκαν για τους ενδεικνυόμενους χρόνους με R(+)-MA ή ψεRACK, απουσία ή παρουσία του PKCε αναστολέα εV1-2, και τα PKCε ανοσοσύμπλοκα (που προέκυψαν με 1 mg IgG από 500 μg ολικής πρωτεΐνης ανά συνθήκη) αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση περιεχόμενων φωσφορυλιωμένων μορίων της Fyn (Thr12) (άνω πάνελ), ώστε να δειχθεί διαμοριακή αλληλεπίδραση, ή για την PKCε (κάτω πάνελ), προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα της ανοσοκατακρημνισμένης PKCε. (Β) Αμοιβαία, η PKCε συν-ανοσοκατακρημνίστηκε με τη Fyn (άνω πάνελ) μετά από ενεργοποίηση του CB1R, όπως αποκάλυψε ανοσοαποτύπωση σε ανοσοσύμπλοκα της Fyn που προέκυψαν από ίσες ποσότητες νευρωνικών εκχυλισμάτων (κάτω πάνελ). (Γ) Παρομοίως, τα μόρια της Src (άνω πάνελ) που συν-ανοσοκατακρημνίστηκαν με ίσες ποσότητες PKCε (κάτω πάνελ) αυξήθηκαν δραστικά μετά από έκθεση σε R(+)-MA. Όλα τα σύμπλοκα των κινάσων αναστάλθηκαν από τον εV1-2 (Asimaki and Mangoura, *Neurochem Int* 2011) [291].

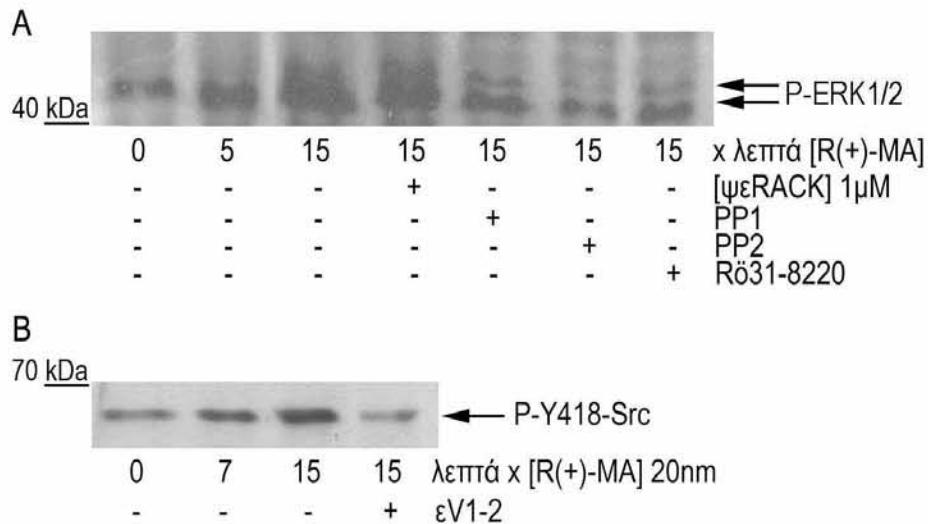
### 3.5. *ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΑΠΟ ΤΟΝ CB1R ΜΕΣΩ PKCε-Src/Fyn-Ras-Raf ΚΑΙ ΔΙΑΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ EGFR ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5Y-CB1R*

Μέχρι τώρα παρουσιάστηκαν τα δεδομένα που αφορούν τα πρώιμα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα με την πρόσδεση αγωνιστή στο CB1 υποδοχέα και επάγουν την ενεργοποίηση της ERK σε νευρωνικό περιβάλλον. Προκειμένου, όμως, να μελετηθούν τα μοριακά γεγονότα που έπονται της ενεργοποίησης του CB1R και της επακόλουθης ενεργοποίησης των PKCε και Src/Fyn κινασών και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, και καθώς η καλλιέργεια πρωτογενών νευρώνων επιφέρει περιορισμούς στους ρυθμούς που πραγματοποιούνται οι πειραματικές διαδικασίες, κρίθηκε σκόπιμο τα επόμενα πειράματα να διεξαχθούν αρχικά σε νευρωνικής προέλευσης κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει σταθερά το CB1R, προτού οι μηχανισμοί διερευνηθούν διεξοδικά σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ανταποκρίνονται σε αυτά που προέρχονται από πρωτογενείς νευρώνες και, συνεπώς, το προτεινόμενο μονοπάτι αντανακλάται και στα δύο νευρωνικά περιβάλλοντα.

#### 3.5.1. Ενεργοποίηση της ERK από τον CB1R κατά τρόπο διφασικό μέσω PKCε και Src/Fyn στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα

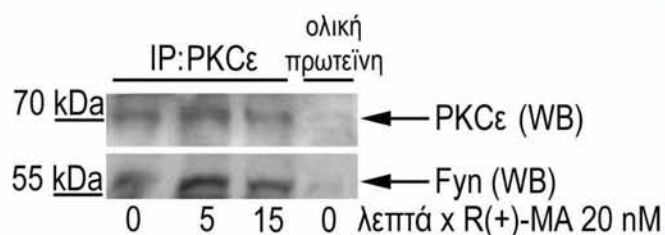
Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν οι μηχανισμοί που δείχθηκαν να μεσολαβούν στην ενεργοποίηση της ERK από το CB1R στους πρωτογενείς νευρώνες είναι αντίστοιχοι με αυτούς που ενεργοποιούνται από R(+)-MA στην SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά, ακολουθήθηκε συνοπτικότερη, αλλά ωστόσο παρόμοια πειραματική διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε στα προηγούμενα κεφάλαια. Πράγματι, ανάλυση ανοσοαποτύπωσης αποκάλυψε ότι στα SH-SY5Y κύτταρα που υπερεκφράζουν σταθερά το CB1R, όπως ακριβώς και στους πρωτογενείς νευρώνες, χορήγηση R(+)-MA προκάλεσε ενεργοποίηση της ERK τόσο στα 5 λεπτά όσο και στα 15 λεπτά (**Εικ.24Α**). Σημαντικότερα, η ενεργοποίηση αναστάληκε τόσο από PP1 και PP2 αναστολείς όσο και από R531-8220, υποδεικνύοντας σαφέστατα ότι κινάσες τυροσίνης και κάποια νεοφανής PKC μετέχουν, επίσης, στην προκαλούμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της ERK στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα (**Εικ.24Α**). Επιπλέον, η R(+)-MA βρέθηκε να επάγει χρονοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της Src, η οποία καταργήθηκε όταν προηγήθηκε επώαση με τον ειδικό για την PKCε πεπτιδικό αναστολέα εV1-2 (**Εικ.24Β**), οδηγώντας ξεκάθαρα στο συμπέρασμα ότι και στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα η nPKCε προηγείται της ενεργοποίησης των Src κινασών τυροσίνης στο μονοπάτι CB1R-ERK.





**Εικόνα 24.** Η ενεργοποίηση της ERK από R(+)-MA στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα είναι διφασική και μεσολαβείται από την PKCε άνωθεν των Src/Fyn. (Α) SH-SY5Y-CB1R κύτταρα μετά από 16 ώρες υποθρεψίας επωάστηκαν με μάρτυρα ή με 20 nM R(+)-MA για 5 ή 15 λεπτά, απουσία ή παρουσία 1 μM ψεRACK, 10 μM PP1, 20 μM PP2 ή 1 μM Rō31-8220 για 20 λεπτά, και ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση των φωσφορυλιωμένων μορφών της ERK. (Β) Ανίχνευση της ενεργοποίησης της Src μετά από έκθεση σε R(+)-MA, απουσία ή παρουσία εV1-2, όπως καταδεικνύεται από ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης Src (PY418).

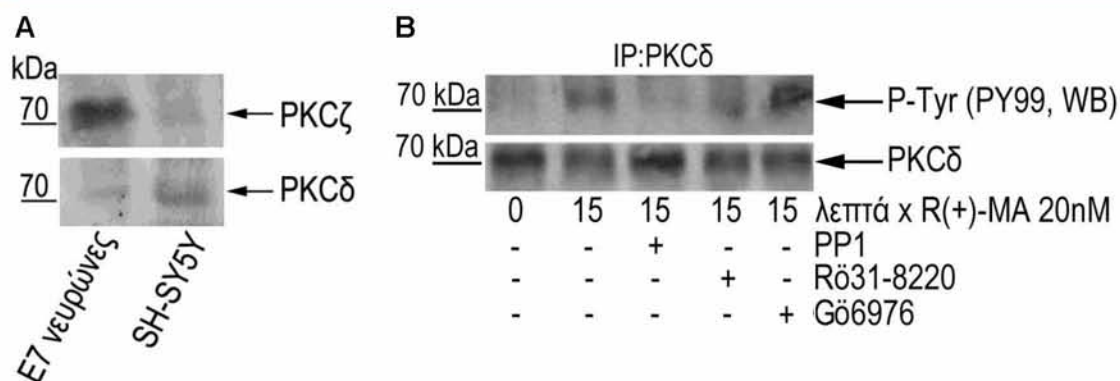
Στη συνέχεια, δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης αποκάλυψε ότι η PKCε οδηγεί στην ενεργοποίηση των Src/Fyn και στη μετέπειτα ενεργοποίηση της ERK, μέσω σχηματισμού συμπλόκων με τις Src κινάσες, μηχανισμός που αρχικά αναδείχθηκε στους πρωτογενείς νευρώνες προερχόμενους από νεοσσό όρνιθας και παρουσιάστηκε διεξοδικά στην ενότητα 3.2.2. Συγκεκριμένα, ερεθισμός του CB1R με R(+)-MA στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα για 5 και 15 λεπτά, προκάλεσε αξιοσημείωτη αύξηση της σύνδεσης της ενεργοποιημένης PKCε με την επίσης ενεργοποιημένη τυροσινική κινάση Fyn, όπως κατέδειξε ανοσοκατακρήμνιση της PKCε και ανίχνευση μέσω ανοσοαποτύπωσης της συνδεδεμένης Fyn (**Εικ.25**).



**Εικόνα 25.** Η ενεργοποιούμενη από R(+)-MA PKCε συνδέεται με τις Fyn/Src κινάσες τυροσίνης στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν για τους ενδεικνυόμενους χρόνους με R(+)-MA και τα PKCε ανοσοσύμπλοκα (που προέκυψαν με 1 mg IgG από 500 μg ολικής πρωτεΐνης ανά συνθήκη) αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση περιεχόμενων μορίων της Fyn (κάτω πάνελ), ώστε να δειχθεί διαμοριακή αλληλεπίδραση, ή για την PKCε (άνω πάνελ), προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα της ανοσοκατακρήμνισμένης PKCε.

Σύμφωνα με τα ευρήματα που σημειώθηκαν σε πρωτογενείς νευρώνες, η PKCζ ισομορφή ευρίσκεται καθοδικά (downstream) της nPKCε και των Src κινασών στο μονοπάτι του CB1R. Παρόλο που τα μέχρι τώρα δεδομένα που αφορούν την ενεργοποίηση της ERK από το CB1R σε SH-SY5Y-CB1R κύτταρα συνάδουν απόλυτα με αυτά που προέκυψαν από τους πρωτογενείς νευρώνες και, ενώ αντίστοιχες αναλύσεις αποκάλυψαν πως πράγματι μία PKC έπεται των PKCε και Src κινασών, ωστόσο ανάλυση της έκφρασης και φωσφορυλίωσης των PKC ισομορφών κατέδειξαν πως η ισομορφή PKCδ είναι η δεύτερη PKC που μετέχει στο μονοπάτι του CB1R στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα. Συγκεκριμένα, αντίθετα με τους E7 πρωτογενείς νευρώνες που παρατηρείται υψηλή έκφραση της PKCζ, στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα η έκφραση της PKCζ είναι χαμηλή, ενώ η έκφραση της νεοφανούς PKCδ σημαντικά μεγαλύτερη (**Εικ.26Α**). Εν συνεχεία, ανοσοκατακρήμνιση της PKCδ και ανοσοαποτύπωση με PY99 αντίσωμα που αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, αποκάλυψε αυξημένη ενεργοποίησή της μετά από έκθεση σε R(+)-MA για 15 λεπτά (**Εικ.26Β**). Σημαντικότερα, η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση της PKCδ βρέθηκε να αναστέλλεται από PP1 και Rō31-8220 αναστολείς, αλλά όχι από Gō6976 (**Εικ.26Β**), υποδεικνύοντας ότι στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα η PKCδ ισομορφή ευρίσκεται καθοδικά (downstream) της nPKCε και των Src κινασών στο μονοπάτι του CB1R.

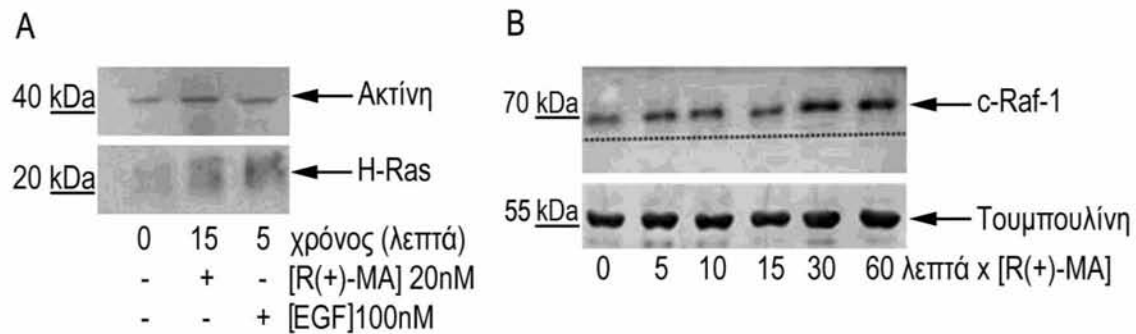




**Εικόνα 26.** Η PKCδ εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από την PKCζ στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα και φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνη από R(+)-MA κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη nPKCε και τις Src κινάσες. (Α) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ολικών πρωτεϊνών E7 νευρώνων και SH-SY5Y κυττάρων (20 μg) με αντισώματα έναντι της PKCζ και PKCδ για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών. (Β) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της κατακρημνισμένης (IP) PKCδ με το ειδικό για φωσφορυλίωση σε τυροσίνη αντίσωμα PY99 (άνω πάνελ) και με PKCδ αντίσωμα (κάτω πάνελ) για εκτίμηση των επιπέδων της κατακρημνισμένης PKCδ. Ανάλογα με τη συνθήκη, έχει προηγηθεί ή όχι της χορήγησης R(+)-MA (20 nM), επώαση των SH-SY5Y-CB1R κυττάρων για 20 λεπτά με τον αναστολέα των Src κινάσων PP1 (10 μM) ή με τον αναστολέα των νεοφανών και κλασσικών PKC ισομορφών Rö31-8220 (1 μM) ή με τον αναστολέα των κλασσικών PKC ισομορφών Gö6976 (1 μM).

### 3.5.2. Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras και Raf από τον CB1R μέσω διενεργοποίησης του EGFR

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η PKC επάγει ενεργοποίηση των MAPK δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί και, ως ένα βαθμό, φαίνεται να εξαρτώνται από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο που μελετάται. Ωστόσο, είναι σαφώς τεκμηριωμένο πως σε πολλές περιπτώσεις, η PKC μέσω της ενεργοποίησης των κινάσων τυροσίνης προκαλεί διέγερση της Ras, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη Raf και, διαμέσου της ενεργοποίησης της MEK, επέρχεται φωσφορυλίωση του τελευταίου μέλους του μονοπατιού, δηλαδή της ERK. Πράγματι, δοκιμασία δραστηριότητας της Ras πρωτεΐνης (Ras assay) στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα αποκάλυψε αύξηση της δραστηριότητάς της μετά από ερεθισμό με R(+)-MA για 15 λεπτά, συγκρίσιμη με αυτή που επέρχεται μετά από ερεθισμό με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), γνωστό ότι επάγει ενεργοποίηση της Ras (**Εικ.27Α**). Επιπλέον, εκτός από την ενεργοποίηση της Ras, η R(+)-MA προκάλεσε ισχυρή ενεργοποίηση της Raf1 στα ίδια κύτταρα κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο. Συγκεκριμένα, η προκαλούμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της Raf1 κατέστη εμφανής μετά τα 5 λεπτά επώασης και διήρκεσε για τουλάχιστον μία ώρα (**Εικ.27Β**). Η ενεργοποίηση της Raf1 πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσής της και ανιχνεύεται ως αλλαγή της κινητικότητάς της (mobility shift) (**Εικ.27Β**).



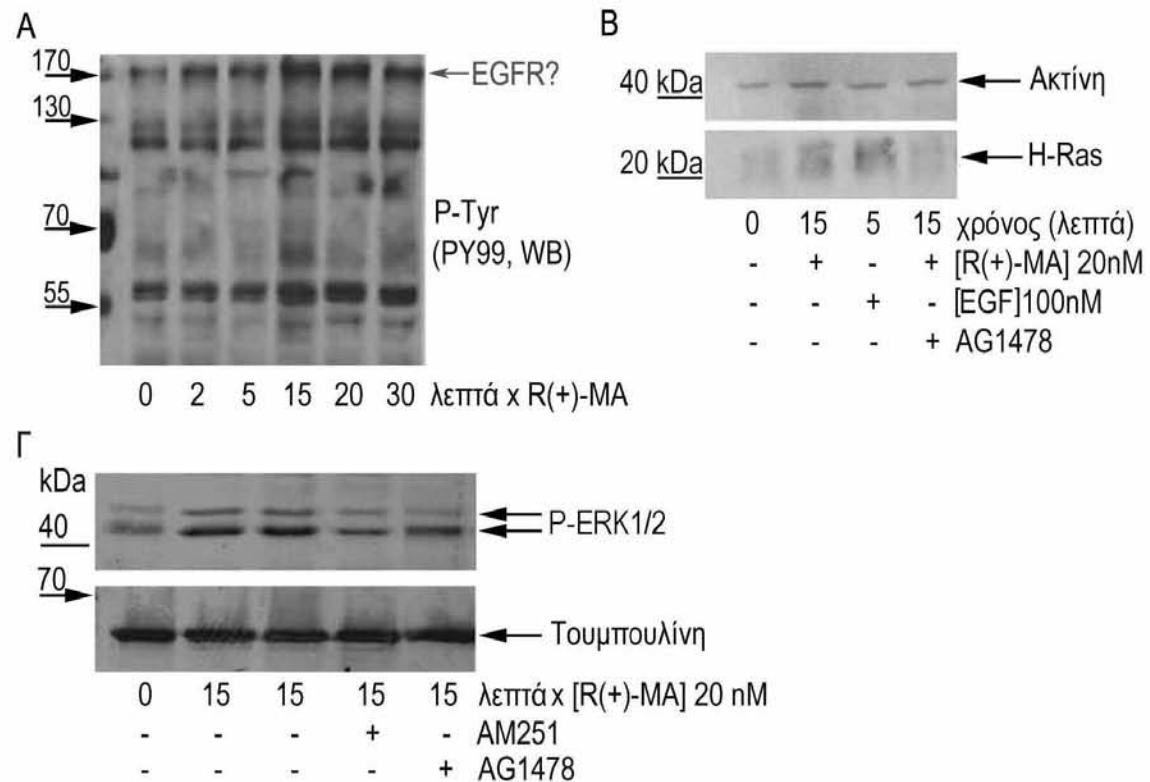
**Εικόνα 27. Ενεργοποίηση της Ras και της Raf1 από R(+)-MA.** (A) Δοκιμασία δραστικότητας της Ras (Ras assay, βλ. μεθόδους) στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα μετά από 16 ώρες υποθρεψίας, και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με H-Ras αντίσωμα, κατέδειξαν ενεργοποίηση της Ras μετά από ερεθισμό με R(+)-MA (20 nM) για 15 λεπτά και EGF (100 nM) για 5 λεπτά που αποτέλεσε θετικό μάρτυρα ελέγχου. Ο έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση ακτίνης στις ίδιες μεμβράνες νιτροκυταρίνης. (B) Κύτταρα SH-SY5Y-CB1R, μετά από 16 ώρες υποθρεψίας, επωάστηκαν για τους αναφερόμενους χρόνους με 20 nM R(+)-MA και η ενεργοποίηση της Raf1 ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση με c-Raf1 αντίσωμα. Η χρονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της Raf1 διαφαίνεται εν συγκρίσει με τη διακεκομμένη γραμμή που υποδηλώνει την κινητικότητα της Raf1 σε δείγματα ελέγχου. Ο έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση τουμπουλίνης.

Οι οδοί μεταγωγής σήματος που συνδέουν τους GPCRs με το μονοπάτι Ras/MAPK, εκτός από PKCs και/ή κινάσες τυροσίνης, έχειδειχθεί να περιλαμβάνουν την ανεξάρτητη από πρόσδεμα διενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs), όπως του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), η οποία αποτελεί σημείο-κλειδί της MAPK ενεργοποίησης από υποδοχείς συζευγμένους τόσο με  $G_i$  όσο και με  $G_{q/11}$  πρωτεΐνες [188,295]. Καθώς η ενεργοποίηση του CB1R, όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό κομμάτι, έχειδειχθεί να προκαλεί διενεργοποίηση του EGFR σε μη νευρωνικού τύπου κυτταρικές σειρές [200], όπως, επίσης, και διενεργοποίηση των VEGFR και TrkB [195,62, αντίστοιχα], το επόμενο βήμα ήταν να εξεταστεί το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης κάποιου RTK από το CB1R για την ενεργοποίηση της ERK στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα.

Η αρχική παρατήρηση ότι η R(+)-MA προκάλεσε, μεταξύ άλλων πρωτεϊνών, χρονοεξαρτώμενη φωσφορυλίωση σε θέσεις τυροσίνης μιας πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 170 kDa (**Εικ.28Α**) που συνάδει απόλυτα με αυτό του υποδοχέα του EGF, οδήγησε στη διερεύνηση του EGFR ως πιθανού RTK που μετέχει στο CB1R-ERK μονοπάτι στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα. Πράγματι, η επαγόμενη από R(+)-MA αύξηση της δραστικότητας της Ras αναστάλθηκε από τον ειδικό αναστολέα της

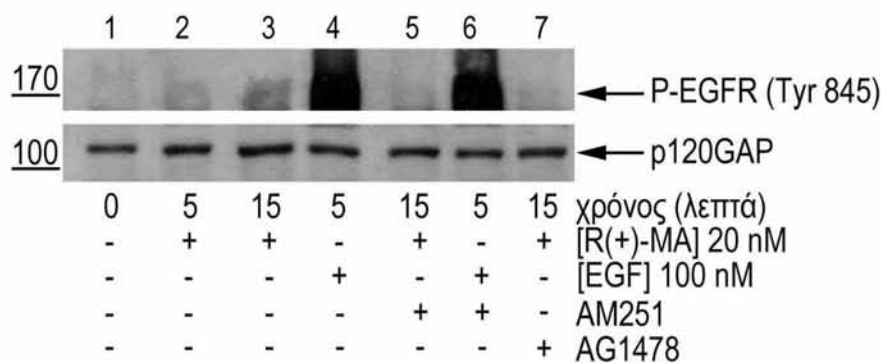


δραστικότητας του EGFR, AG1478 (tyrphostin [1μM]) (**Εικ.28B**). Ταυτόχρονα, ο AG1478 είχε ακριβώς την ίδια επίδραση και στην εξαρτώμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της ERK, μειώνοντας τη φωσφορυλίωσή της σε επίπεδα ανάλογα με αυτά που παρατηρούνται μετά από επώαση με τον ειδικό ανταγωνιστή του CB1R AM251 (**Εικ.28Γ**), υποδηλώνοντας σαφώς τη μεσολάβηση του EGFR στην επαγόμενη από CB1R ενεργοποίηση της ERK.



**Εικόνα 28. Ο CB1R ενεργοποιεί τη Ras και την ERK μέσω διενεργοποίησης του EGFR.** (Α) SH-SY5Y-CB1R κύτταρα μετά από 16 ώρες υποθρεψίας, επωάστηκαν για τους ενδεικνυόμενους χρόνους με R(+)-MA (20 nM), και μετά από ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι της φωσφοτυροσίνης (PY99) ανιχνεύθηκαν φωσφορυλιώσεις σε θέσεις τυροσίνης πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού βάρους. (Β) Η προηγούμενη ενεργοποίηση της Ras από R(+)-MA που αποκαλύφθηκε από τη δοκιμασία δραστηριότητας της Ras καταργήθηκε από τον AG1478 αναστολέα του EGFR. (Γ) Τα κύτταρα επωάστηκαν για τους αναφερόμενους χρόνους με 20 nM R(+)-MA, αφού προηγήθηκε ή όχι για 20 λεπτά χορήγηση του CB1R ανταγωνιστή AM251 (5 μM) ή του αναστολέα της δραστηριότητας του EGFR AG1478 (1 μM), και ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων μορφών της ERK (άνω πάνελ) και της τουμπουλίνης (κάτω πάνελ) για έλεγχο της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων.

Τα προηγούμενα ευρήματα που αποτελούν ενδείξεις για τη διενεργοποίηση του EGFR από το CB1R, υποστηρίχθηκαν περαιτέρω από την παρατηρούμενη φωσφορυλίωση του EGFR στην τυροσίνη 845, γνωστή θέση φωσφορυλίωσης του EGFR από τη Src, μετά από επώαση με R(+)-MA (**Εικ.29**). Η επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση του EGFR, αν και σαφώς μειωμένη σε σχέση με τη φωσφορυλίωση που προκαλεί ο EGF (λωρίδα 4), εμφανίστηκε εντονότερη στα 15 λεπτά σε σχέση με τα 5 λεπτά (λωρίδα 3 έναντι 2) και αναστάλθηκε από τον AG1478 (λωρίδα 7) και, σημαντικότερα, από τον ανταγωνιστή του CB1R AM251 (λωρίδα 5) (**Εικ.29**), υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του EGF υποδοχέα έπεται της ενεργοποίησης του CB1R. Η προκαλούμενη από τον EGF ενεργοποίηση του EGFR δεν αναστάλθηκε από τον AM251 (λωρίδα 6), όπως ήταν αναμενόμενο.



**Εικόνα 29. Φωσφορυλίωση του EGFR από R(+)-MA.** SH-SY5Y-CB1R κύτταρα μετά από 16 ώρες υποθρεψίας, επωάστηκαν για τους ενδεικνυόμενους χρόνους με R(+)-MA (20 nM) ή EGF (100 nM), απουσία ή παρουσία AM251 (5 μM) ή AG1478 (1 μM), και ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα που ανιχνεύει τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 845 (Tyr 845) του EGF υποδοχέα. Ο έλεγχος της ομαλοποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση της p120GAP πρωτεΐνης.

### 3.5.3. Επιστράτευση των CB1 και EGF υποδοχέων στις λιπιδικές σχεδίες μετά από ενεργοποίηση με κανναβινοειδή

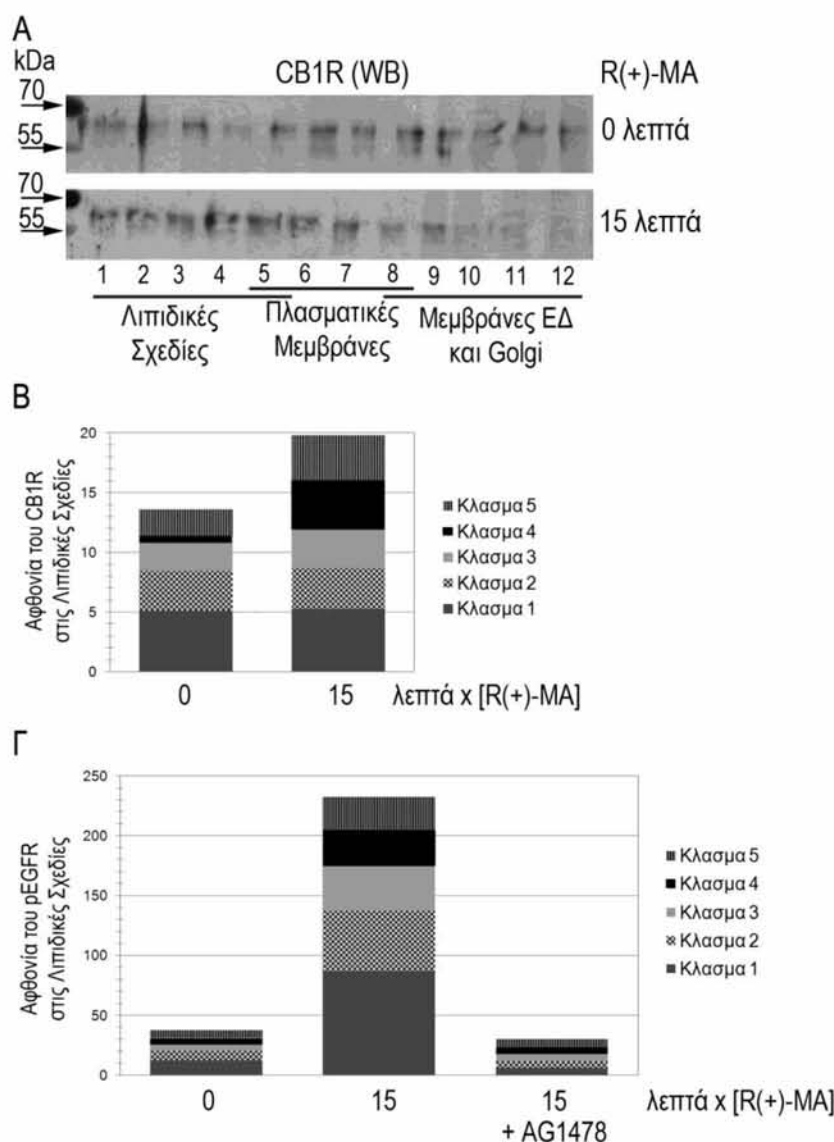
Ο EGFR είναι γνωστό ότι εδρεύει στις λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts: μικροπεριβάλλοντα της πλασματικής μεμβράνης πλούσια σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια που περιέχουν μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μορίων). Για τη μεταγωγή σήματος του CB1R, ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι ο διαταράκτης (disruptor) των λιπιδικών σχεδιών MβCD διπλασιάζει την ικανότητα πρόσδεσης του υποδοχέα στα κανναβινοειδή και οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση της ενεργοποίησης της ERK.



Συνεπώς, οι λιπιδικές σχεδίες έχουν προταθεί ως οι πλατφόρμες στις οποίες λαμβάνει χώρα η έναρξη της σηματοδότησης του CB1 υποδοχέα [220], χωρίς, ωστόσο, ο εντοπισμός του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες σε νευρωνικό περιβάλλον να έχει καταδειχθεί.

Προτού μελετήσουμε την κατανομή του CB1R σε πρωτογενείς νευρώνες υπό φυσιολογικές συνθήκες και μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα, εξετάσαμε το ενδεχόμενο οι λιπιδικές σχεδίες να είναι και οι μοριακές πλατφόρμες στις οποίες συμβαίνει η αλληλεπίδραση του CB1R με τον EGFR στην SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά. Ανάλυση της υποκυτταρικής κατανομής του CB1R, χρησιμοποιώντας μέθοδο απομόνωσης λιπιδικών σχεδιών απουσία απορρυπαντικού, προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής διαχωρισμός των γνήσιων λιπιδικών σχεδιών από πλασματικές μεμβράνες μη σχεδιών και μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi [290], αποκάλυψε εμπλουτισμό του ενεργοποιημένου με R(+)-MA CB1R στις λιπιδικές σχεδίες εν συγκρίσει με την κατανομή που παρατηρείται σε φυσιολογικές συνθήκες (**Εικ.30Α και Β**). Συγκεκριμένα, ο CB1R σε φυσιολογικές συνθήκες στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα εντοπίστηκε, ως επί το πλείστον, κατανεμημένος στα κλάσματα 5-9 που περιέχουν πλασματικές μεμβράνες μη λιπιδικών σχεδιών, μιτοχόνδρια, και μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ μετά από ενεργοποίησή του με R(+)-MA παρατηρήθηκε ανακατανομή του υποδοχέα στα κλάσματα 1-5 που περιέχουν κυρίως λιπιδικές σχεδίες (**Εικ.30Α και Β**). Σημαντικότερα, διαπιστώσαμε ότι επώαση με R(+)-MA προκάλεσε, επίσης, μετακίνηση των φωσφορυλιωμένων μορφών του EGFR στα ίδια κλάσματα με αυτά που εντοπίστηκε ο CB1R (κλάσματα 1-5) και, μάλιστα, ο εν λόγω εμπλουτισμός του ενεργοποιημένου από R(+)-MA EGFR στις λιπιδικές σχεδίες βρέθηκε εξαιρετικά σημαντικός, δράση η οποία αναστάλθηκε ολοκληρωτικά από τον AG1478 (**Εικ.30Γ**).

Τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν την πρώτη μαρτυρία ότι σε νευρωνικό περιβάλλον, η ρύθμιση της ενεργοποίησης της ERK και διαφόρων μεταγραφικών γεγονότων από τον CB1 υποδοχέα, επιτυγχάνεται μέσω της διενεργοποίησης του EGFR μετά από μοριακές αλληλεπιδράσεις στις σχεδίες λιπιδίων.



**Εικόνα 30. Αλληλεπίδραση CB1R και EGFR στις σχεδίες λιπιδίων στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα.**

(Α) Εντοπισμός του CB1R και μετακίνησή του στις λιπιδικές σχεδίες μετά από επώαση με R(+)-MA. SH-SY5Y-CB1R κύτταρα, προγονικά ή επωασμένα με R(+)-MA για 15 λεπτά, υποβλήθηκαν σε κλασμάτωση (η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθόδους). Τυπική ανάλυση ανοσοαποτύπωσης που απεικονίζει την αφθονία του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες (κλάσματα 1-4 ή 5), σε μεμβράνες μη σχεδιών (κλάσματα 5-8) και σε μεμβράνες ΕΔ και Golgi (κλάσματα 9-12). (Β) Πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες. Οι τιμές αποτελούν τη μέση τιμή ανοσοαντίδρασης του CB1R σε 3 δείγματα, ομαλοποιημένες με βάση το περιεχόμενο πρωτεΐνης (π.χ. η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο κλάσμα 1 είναι η μισή σε σχέση με αυτή του κλάσματος 5). (Γ) Αντίστοιχα ανιχνεύθηκε και η αφθονία φωσφορυλιωμένων μορφών του EGFR στις λιπιδικές σχεδίες σε προγονικά ή επωασμένα με R(+)-MA SH-SY5Y-CB1R κύτταρα, απουσία ή παρουσία AG1478. Πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας του pEGFR στις λιπιδικές σχεδίες.

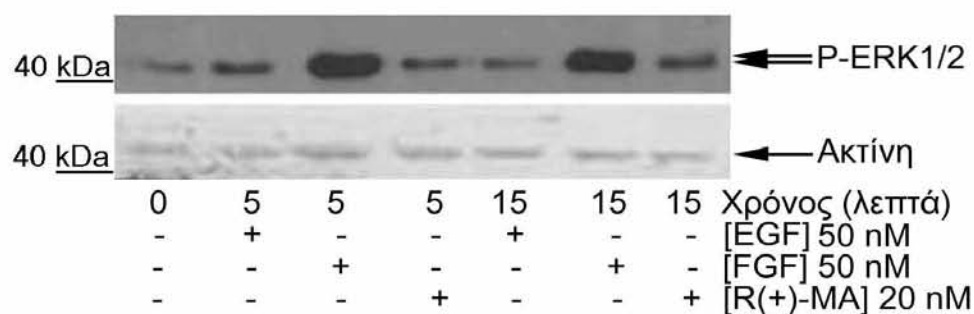


### 3.6. Ο CB1R ΕΠΑΓΕΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK ΜΕΣΩ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΤΙΣ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΣΧΕΔΙΕΣ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ FGFR ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

#### 3.6.1. Διενεργοποίηση του FGFR από τον CB1R επάγει ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK μέσω των PKCε, Src & Fyn σε πρωτογενείς νευρώνες

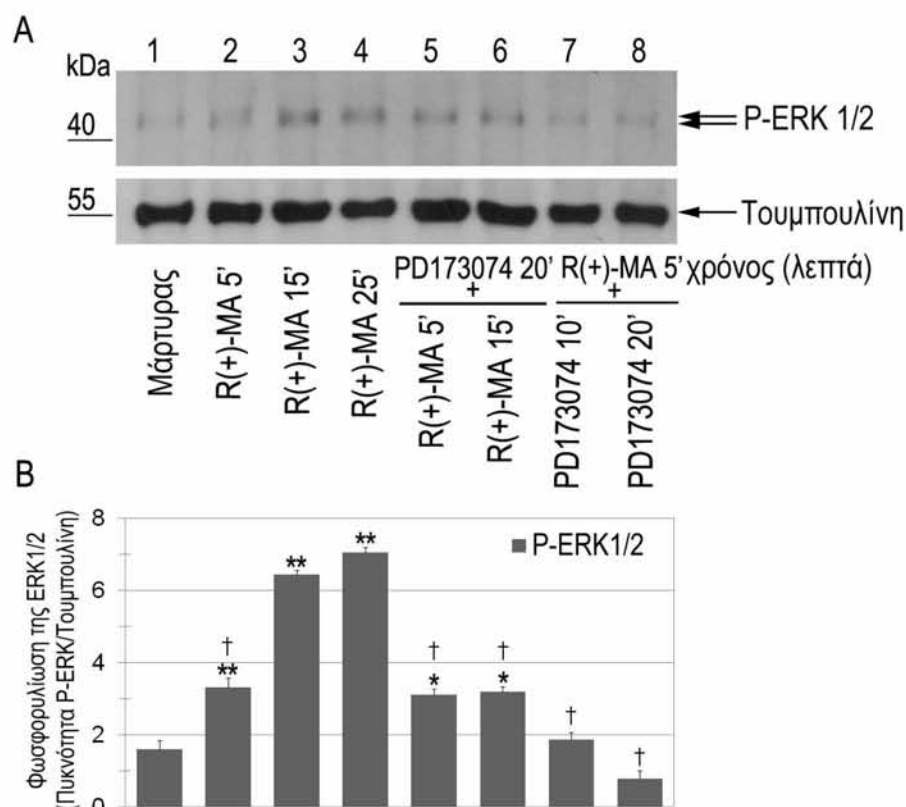
Τα αποτελέσματα των ευρημάτων μας που αφορούν την εγγύς μεταγωγή σήματος του CB1R σε πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες νεοσσού όρνιθας 7 ημερών αποκάλυψαν, όπως δείχθηκε προηγουμένως, ότι η ενεργοποίηση του CB1R με R(+)-MA επάγει ενεργοποίηση της ERK κατά τρόπο διφασικό, ενώ μακροπρόθεσμα επιφέρει νευριτική ανάπτυξη. Η ένταση της δεύτερης ενεργοποίησης της ERK στα 15 λεπτά, σε συνδυασμό με τα αμέσως προηγούμενα ευρήματά μας τα οποία καταδεικνύουν αλληλεπίδραση του CB1R με τον EGFR στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα, αλλά και την εδραιωμένη διασταυρούμενη επικοινωνία του (cross talk) με άλλους RTKs, όπως τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR), οδήγησαν στη διερεύνηση της συμμετοχής ενός RTK στη μεταγωγή σήματος του CB1R σε πρωτογενείς νευρώνες.

Επώαση των νευρώνων με EGF (50 nM) για 5 και 15 λεπτά προκάλεσε σημαντικά μειωμένη ενεργοποίηση της ERK σε σχέση με την αντίστοιχη που βρέθηκε να επάγει ο FGF (50 nM) (**Εικ.31**), υποδηλώνοντας την επικράτηση του FGF υποδοχέα στους φλοιϊκούς νευρώνες νεοσσού όρνιθας και – δεδομένης της εδραιωμένης αλληλεπίδρασης του CB1R με τον FGFR [210] – το ενδεχόμενο ο FGFR να είναι ο υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης που χρησιμοποιεί ο CB1R σαν ενδιάμεσο δρομολογητή (signaling intermediate) για την ενεργοποίηση της ERK.



**Εικόνα 31.** Ο FGF επάγει σημαντική ενεργοποίηση της ERK στους νευρώνες νεοσσού όρνιθας. Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης της ERK φωσφορυλίωσης μετά από επώαση με EGF (50 nM), FGF (50 nM) ή R(+)-MA (20 nM) για 5 και 15 λεπτά και ομαλοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων με ακτίνη.

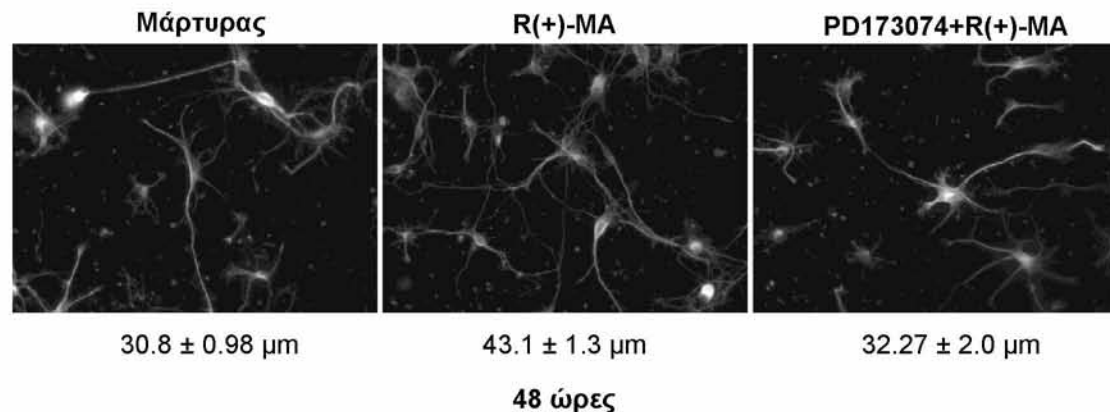
Πράγματι, προεπώαση των νευρώνων με PD173074, έναν ειδικό αναστολέα του FGFR που καταργεί την εξαρτώμενη από FGF2 ενεργοποίηση της ERK1/2 και τη νευριτογένεση [211], μείωσε σημαντικά τη δεύτερη αύξηση-κορύφωση της προκαλούμενης από R(+)-MA ενεργοποίησης της ERK που έχει διάρκεια 15 έως 25 λεπτά (**Εικ.32A και B**, λωρίδες 3 και 4 vs.6), αλλά όχι την πρώτη (**Εικ.32A και B**, λωρίδα 2 vs.5). Επιπλέον, έκθεση των νευρώνων στον αναστολέα 5 λεπτά έπειτα από την προσθήκη R(+)-MA, ανέστειλε ολοκληρωτικά επίσης τη δεύτερη φάση της ενεργοποίησης της ERK (15-25 λεπτά) (**Εικ.32A και B**, λωρίδες 3 και 4 vs.7 και 8).



**Εικόνα 32.** Η ενεργοποίηση του FGFR ενισχύει τη δεύτερη φάση ενεργοποίησης της ERK από το R(+)-MA. (A) E7 πρωτογενείς νευρώνες επωάστηκαν με 20 nM R(+)-MA για τις ενδεικνυόμενες χρονικές περιόδους απουσία ή παρουσία 50 nM PD173074, προστιθέμενου 20 λεπτά πριν (λωρίδες 5 και 6) ή 5 λεπτά μετά (λωρίδες 7 και 8) από το R(+)-MA, και ανιχνεύθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης η ενεργοποίηση της ERK1/2 (άνω πάνελ) και η τουμπουλίνη για ομαλοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων (κάτω πάνελ). (B) Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρία της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK, εκφραζόμενη ως ο λόγος της P-ERK πυκνότητας προς την πυκνότητα τουμπουλίνης, και στατιστική ανάλυση. Οι μπάρες ανταποκρίνονται στις μέσες τιμές  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e) 3-5 δειγμάτων τριών διαφορετικών πειραμάτων. \*  $P < 0.05$  και \*\* $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα (σημείο 0); †  $P < 0.01$  στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι 15 λεπτών έκθεσης σε R(+)-MA (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

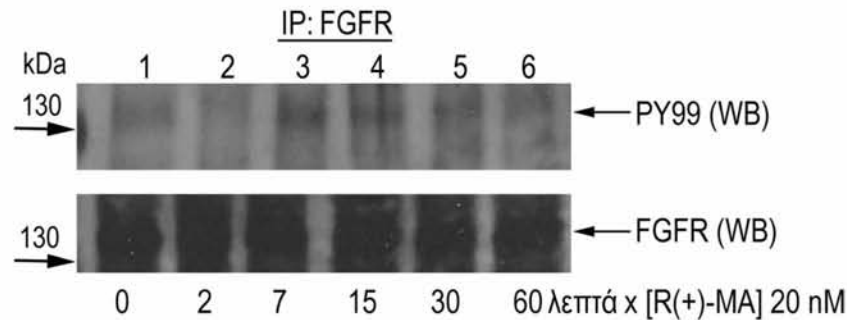


Η αλληλεπίδραση των CB1R-FGFR, πέραν του εμφανούς ρόλου στη μεταγωγή σήματος του πρώτου με την ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK, διαπιστώθηκε ότι έχει και λειτουργική σημασία, καθώς ο PD173074 αναστολέας του FGFR βρέθηκε να καταργεί σε ποσοστό 25% την εξαρτώμενη από το CB1R σημαντική αύξηση του μήκους του κύριου νευρίτη στους E7 πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες (**Εικ.33**).



**Εικόνα 33.** Ο PD173074 καταργεί την προκαλούμενη από R(+)-MA αύξηση στο μήκος του κύριου νευρίτη. Αντιπροσωπευτικό δείγμα νευρώνων που είτε επωάστηκαν με μάρτυρα, είτε με R(+)-MA, είτε προεπώαστηκαν με 50 nM PD173074 πριν τη χορήγηση R(+)-MA για 48 ώρες, και στη συνέχεια ανοσοανιχνεύθηκε η ακτίνη. Η έκθεση σε PD173074 πριν την επώαση με R(+)-MA βρέθηκε να επάγει μείωση της τάξεως 25% στο μήκος του κύριου νευρίτη έναντι του R(+)-MA ( $P < 0.01$ ).

Προκειμένου να εξεταστεί περαιτέρω ο μηχανισμός της διενεργοποίησης του FGFR από το CB1R, FGFR1 ανοσοκατακρημνίσεις νευρώνων, επωασμένων ή όχι με R(+)-MA, υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της φωσφοτυροσίνης (PY99). Η R(+)-MA βρέθηκε πράγματι να επάγει κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο τυροσινική φωσφορυλίωση, και συνεπώς ενεργοποίηση [297] του FGFR, η οποία κορυφώθηκε στα 7 λεπτά και ξεκίνησε σταδιακά να μειώνεται μετά τα 15 λεπτά μέχρι τελικά να καταλήξει στα βασικά της επίπεδα (**Εικ.34**). Η φάση κορύφωσης της ενεργοποίησης του FGFR (7-15 λεπτά) συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το δεύτερο κύμα ενίσχυσης της ενεργοποίησης της ERK που περιγράφηκε προηγουμένως.

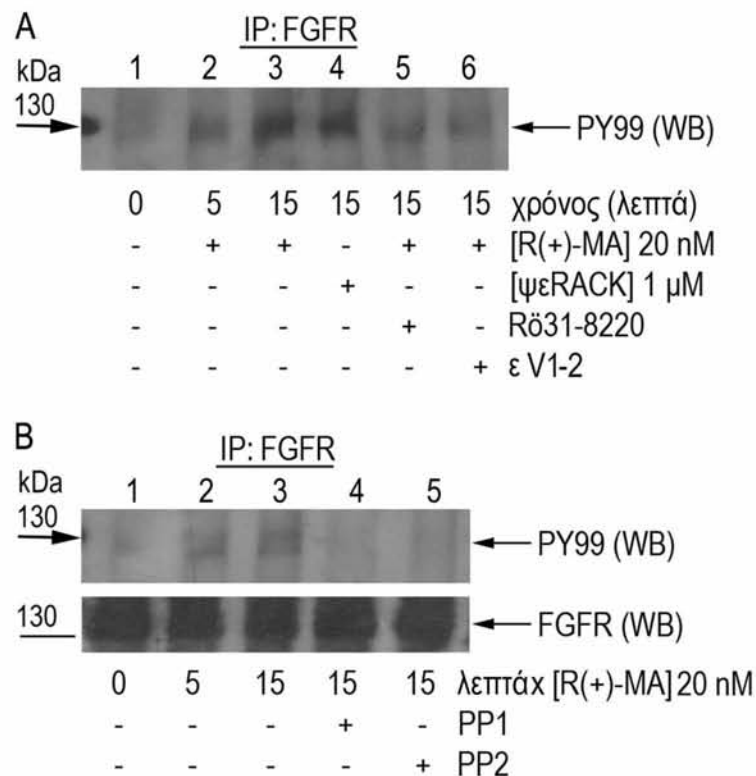


**Εικόνα 34.** Η R(+)-MA επάγει τυροσινική φωσφορυλίωση του FGFR κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο, όπως απεικονίζει ανάλυση ανοσοαποτύπωσης FGFR ανοσοκατακρημνίσεων με αντίσωμα PY99 που αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες (άνω πάνελ), σε ίσες συγκεντρώσεις ανοσοκατακρημνισμένου FGFR (κάτω πάνελ, υβριδοποίηση με FGFR αντίσωμα) (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

Καθώς το πρωιμότερο σηματοδοτικό γεγονός στον CB1R-ERK1/2 καταρράκτη σε E7 πρωτογενείς νευρώνες είναι η διαδοχική οξεία ενεργοποίηση των  $G_{q/11}$ , PLC και PKCε, στη συνέχεια εξετάστηκε ο ρόλος της PKCε στη διενεργοποίηση του FGFR. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκαν τα επίπεδα της τυροσινικής φωσφορυλίωσης του FGFR μετά από έκθεση σε R(+)-MA, παρουσία ή απουσία του επιλεκτικού για την PKCε πεπτιδικού ενεργοποιητή ή αναστολέα, ψεRACK και εV1-2 αντίστοιχα, ή του αναστολέα των νεοφανών και κλασσικών PKC Rō31-8220 (**Εικ.35A**). Άμεση ενεργοποίηση της PKCε με ψεRACK προκάλεσε αυξημένη ενεργοποίηση του FGFR σε τυροσίνη σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά που προκλήθηκαν μετά από 15 λεπτά επώασης με R(+)-MA (**Εικ.35A**, λωρίδες 2 και 3 vs. 4), ενώ αναστολή της PKCε με εV1-2 ή Rō31-8220 μείωσε σημαντικά τη φωσφορυλίωση του FGFR (**Εικ.35A**, λωρίδα 3 vs. 5 και 6). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η προκαλούμενη από το CB1R ενεργοποίηση της PKCε ευρίσκεται άνωθεν της φωσφορυλίωσης του FGFR.

Η ενεργοποιημένη από το CB1R PKCε στους E7 νευρώνες ενεργοποιεί, όπως δείχθηκε στα κεφάλαια 3.1.3 και 3.1.4, τις Src και Fyn κινάσες τυροσίνης, οι οποίες μέσω διαμοριακών φωσφορυλίσεων μπορούν να ενεργοποιήσουν τον FGFR [298]. Κατά τη μελέτη αυτής της πιθανότητας (**Εικ.35B**), βρήκαμε ότι προεπώαση με τους PP1 και PP2 αναστολείς των Src και Fyn κινάσων εμπόδισε ολοκληρωτικά την επαγόμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση του FGFR σε τυροσίνη (**Εικ.35B**, λωρίδα 3 vs. 4 και 5).





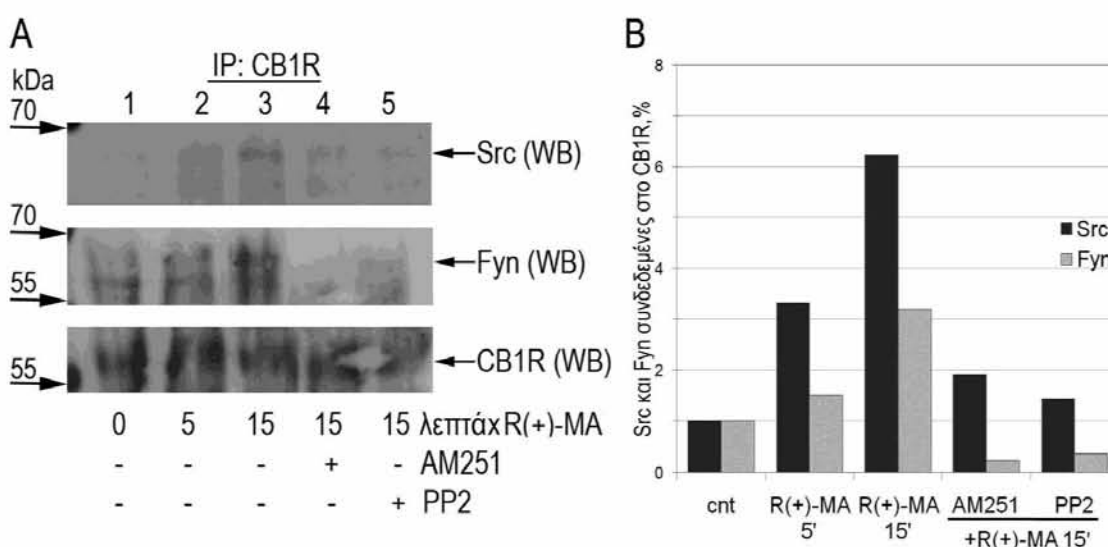
**Εικόνα 35.** Η επαγόμενη από R(+)-MA διενεργοποίηση του FGFR εξαρτάται από τη δραστικότητα των PKCε και Src/Fyn. Η τυροσινική φωσφορυλίωση του FGFR από R(+)-MA είναι ανάλογη με αυτή που προκαλείται από ενεργοποίηση της PKCε με ψεRACK (1 μM), όπως προέκυψε από ανάλυση ανοσοαποτύπωσης FGFR ανοσοκατακρημνίσεων με αντίσωμα PY99, και καταργείται από προεπώαση των νευρώνων με (A) τον ειδικό για την PKCε πεπτιδικό αναστολέα εV1-2 (1 μM) και το Rö31-8220 (1 μM), όπως επίσης και (B) από τους αναστολείς της οικογένειας των Src κινασών PP1 (10 μM) και PP2 (20 μM) (άνω πάνελ). Για την εκτίμηση των επιπέδων του κατακρημνισμένου FGFR πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση με FGFR αντίσωμα (κάτω πάνελ) (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

Συμπερασματικά, στους E7 πρωτογενείς νευρώνες, η ενεργοποίηση των PKCε και Src/Fyn κινασών αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη διενεργοποίηση του FGFR από το CB1R, ενώ η διενεργοποίηση του FGFR είναι επιβεβλημένη ειδικότερα για τη δεύτερη φάση της επαγόμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK.

### 3.6.2. Σχηματισμός πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων του CB1R με τις Src/Fyn κινάσες και τον FGFR

Η επαγόμενη από GPCRs διενεργοποίηση των RTKs συχνά περιλαμβάνει το σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που αποτελούν εγγύς ολοκληρωτές (proximity integrators) της σηματοδότησης και των δύο αυτών τύπων υποδοχέων.

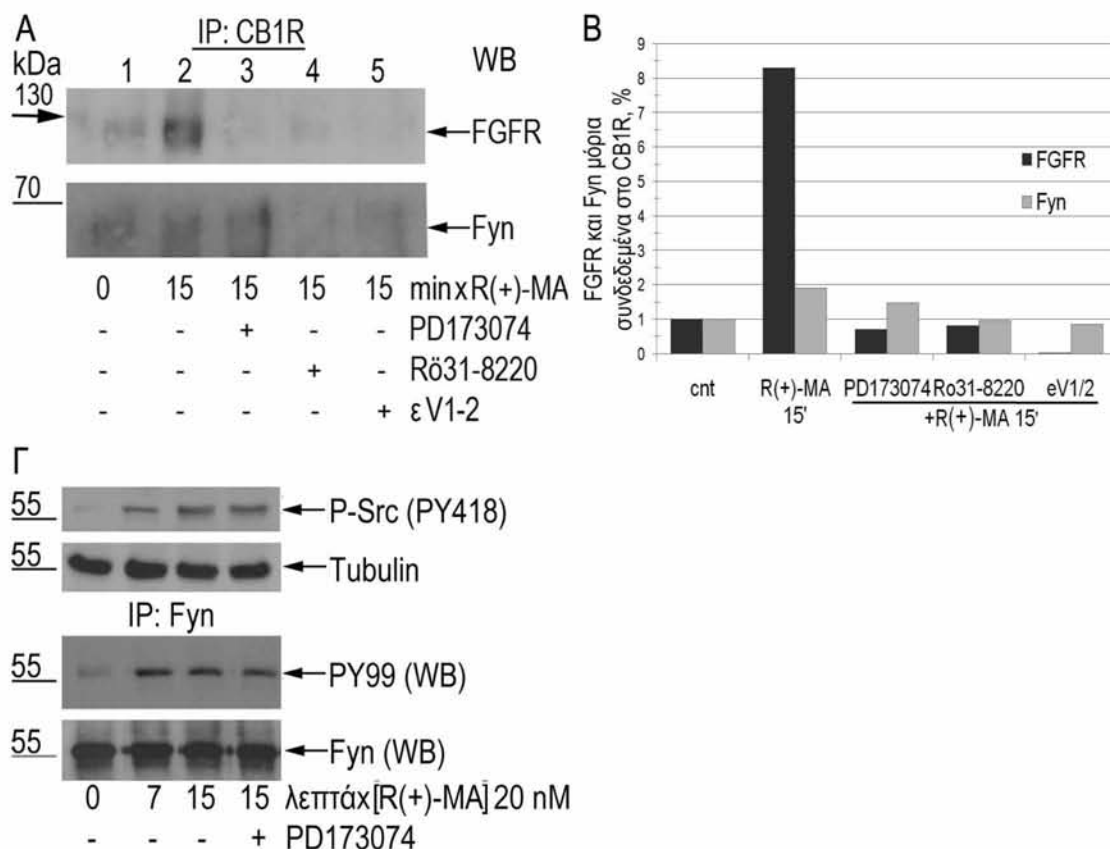
Έτσι, διερευνήθηκε η συν-ανοσοκατακρήμνιση με το CB1R των πρωτεϊνών εκείνων που φέρονται να αλληλεπιδρούν σε επίπεδο σηματοδότησης με τον υποδοχέα (**Εικ.36**). Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι επί τον ερεθισμό E7 νευρώνων με R(+)-MA, επάγεται σχηματισμός ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει το CB1R, τη Src και τη Fyn, και η χρονική πορεία του οποίου υποδηλώνει ότι προηγείται της ενεργοποίησης του FGFR: οι Src και Fyn ανιχνεύθηκαν στις CB1R ανοσοκατακρημνίσεις μόλις στα 5 λεπτά (**Εικ.36A και B**, λωρίδα 2) και τα επίπεδά τους αυξήθηκαν περαιτέρω, 3-6 φορές άνοδος σε σχέση με το μάρτυρα, μετά τα 15 λεπτά έκθεσης (**Εικ.36A και B**, λωρίδα 3). Ο σχηματισμός του CB1R-Src/Fyn συμπλόκου παρουσίασε εξάρτηση από την ενεργοποίηση του CB1R και τη δραστικότητα των Src και Fyn κινασών, καθώς όλες οι αλληλεπιδράσεις καταργήθηκαν από τον ανταγωνιστή του CB1R, AM251 (**Εικ.36A και B**, λωρίδα 4) και από τον αναστολέα των Src κινασών, PP2, αντίστοιχα (PP2 λωρίδα 3 vs. 5).



**Εικόνα 36.** Η R(+)-MA επάγει το σχηματισμό συμπλόκων του CB1R με τις Src και Fyn. (A) Ανοσοκατακρήμνιση μορίων CB1R κατά τους αναφερόμενους χρόνους επώασης με R(+)-MA (20 nM) και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα ειδικά για τη Src και τη Fyn για ανίχνευση αλληλεπιδράσης, και με αντισώματα έναντι του CB1R για την εκτίμηση των επιπέδων του ανοσοκατακρημνισμένου CB1R. Προεπώαση των νευρώνων με το CB1R ανταγωνιστή AM251 (5 μM) και με τον αναστολέα των Src/Fyn PP2 (20 μM) εμπόδισε το σχηματισμό των συμπλόκων, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για ένα εξαρτώμενο από το CB1R γεγονός που απαιτεί την ενεργοποίηση των Src/Fyn. (B) Ποσοτικοποίηση της συν-ανοσοκατακρήμνισης των Src και Fyn με το CB1R μετά από ερεθισμό με R(+)-MA, παρουσία ή απουσία αναστολέων. Οι μπάρες αντιστοιχούν στα ποσοστά επί τοις % των προσδεδμένων στο CB1R, Src και Fyn, στις διάφορες συνθήκες σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].



Το επόμενο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν εάν και ο FGFR συνδέεται με το σύμπλοκο αυτό και, πράγματι, όπως διαφαίνεται και στις **Εικ.37Α και Β**, μία δεξαμενή FGF υποδοχέων ανιχνεύθηκε στις ανοσοκατακρημνίσεις του CB1R μετά από 15 λεπτά επώασης με R(+)-MA. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα της FGFR κινάσης εμφανίστηκε αναγκαία για το σχηματισμό του CB1R-Src-Fyn-FGFR συμπλόκου, καθώς προεπώαση με PD173074 κατήργησε την αλληλεπίδραση CB1R-FGFR (**Εικ.37Α και Β**, λωρίδα 3). Η αναστολή αυτή του FGFR δεν επέφερε, ωστόσο, σημαντικές μεταβολές στη σύνδεση του με τη Fyn (Fyn: **Εικ.37Α και Β**), αλλά ούτε και στην προκαλούμενη από R(+)-MA φωσφορυλίωση των Src και Fyn κινασών (**Εικ.37Γ**). Αντίθετα, και όπως ήταν αναμενόμενο, αναστολή της PKCε με Rō31-8220 ή εV1-2 είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανάκτηση του FGFR και της Fyn (**Εικ.37Α και Β**, λωρίδα 2 vs 4 και 5). Συνεπώς, από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η αλληλεπίδραση του CB1R με τις Src/Fyn προηγείται χρονικά αυτής με τον FGFR.



**Εικόνα 37.** Η R(+)-MA επάγει το σχηματισμό CB1R-Fyn-FGFR συμπλόκων εξαρτώμενων από την ενεργοποίηση της PKCε και του FGFR. (Α) Οι νευρώνες προεπώαστηκαν ή όχι με PD173074 (50 nM) ή με εV1-2 (1 μM) ή Rō31-8220 (1 μM) πριν τη χορήγηση R(+)-MA και ο σχηματισμός CB1R συμπλόκων ανιχνεύθηκε με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των ανοσοκατακρημνισμένων μορίων του

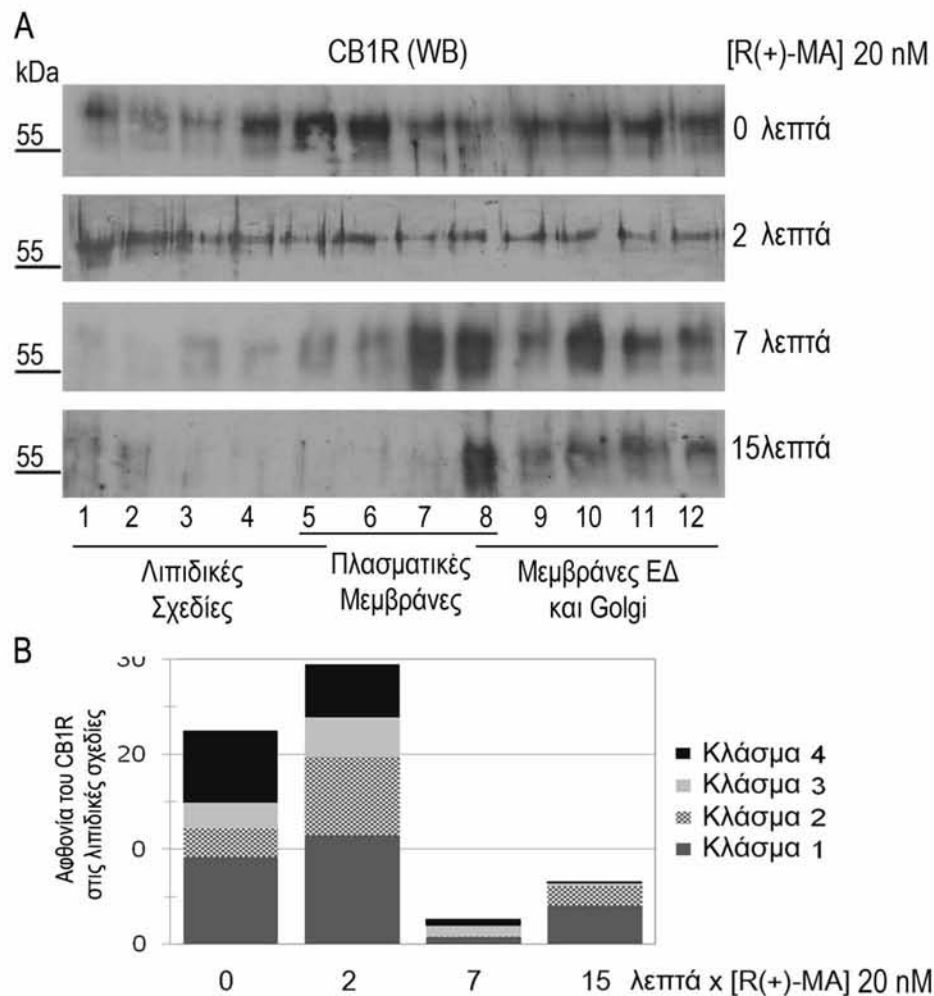
CB1R με αντισώματα έναντι του FGFR και της Fyn. Αναστολή του FGFR με PD173074 κατήργησε την αλληλεπίδραση του FGFR, αλλά όχι της Fyn, με τον CB1R, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση με τη Fyn προηγείται αυτής του FGFR. (B) Ποσοτικοποίηση της συν-ανοσοκατακρήμνισης των Fyn και FGFR με το CB1R μετά από ερεθισμό με R(+)-MA, παρουσία ή απουσία αναστολέων. Οι μπάρες αντιστοιχούν στα ποσοστά επί τοις % των προσδεδεδμένων στο CB1R, Fyn και FGFR, στις διάφορες συνθήκες σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες. (Γ) Προεπώαση των νευρώνων με PD173074 δε βρέθηκε να μειώνει την προκαλούμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση των Src και Fyn, όπως αποκάλυψε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα ενάντια στην P-Src (PY418) και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της ανοσοκατακρημνισμένης Fyn με αντίσωμα ενάντια στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες (PY99), αντίστοιχα (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

### 3.6.3. Η ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδίων ως απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό των CB1R σηματοδοτικών συμπλόκων στους E7 νευρώνες

Καθώς το ενδιαφέρον εύρημα της συνύπαρξης ενός GPCR και ενός RTK σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο μπορεί να αντανakλά γεγονότα τόσο σηματοδότησης όσο και ενδοκύτωσης, καθίσταται απαραίτητη η μελέτη του μηχανισμού της υποκυτταρικής κυκλοφορίας του συμπλόκου CB1R - τυροσινική κίνηση – FGFR διερευνώντας τις υποκυτταρικές περιοχές στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αλληλεπιδράσεις αυτές.

Στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα ανάλυση κλασμάτωσης αποκάλυψε προηγουμένως την επιστράτευση των CB1R και EGFR στις λιπιδικές σχεδίες μετά από ενεργοποίηση του CB1R (κεφάλαιο 3.3.4.). Χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο απομόνωσης λιπιδικών σχεδίων απουσία απορρυπαντικού [290], ο CB1R σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίστηκε στις λιπιδικές σχεδίες, αλλά κατά κύριο λόγο στις μεμβράνες μη λιπιδικών σχεδίων E7 πρωτογενών νευρώνων (**Εικ.38**). Ερεθισμός με R(+)-MA για 2 λεπτά προκάλεσε ταχεία ανακατανομή του CB1R στα κλάσματα που περιέχουν τις λιπιδικές σχεδίες (κλάσματα 1-4 ή 5), υποδηλώνοντας ότι τα πρώιμα γεγονότα της μεταγωγής σήματος του CB1R πιθανά συμβαίνουν στις λιπιδικές σχεδίες. Στα 7 λεπτά επώασης με R(+)-MA παρατηρήθηκε προοδευτική μετακίνηση του CB1R στις μη λιπιδικές μεμβράνες καθώς επίσης και στις μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi, ενώ στα 15 λεπτά ο CB1R ανιχνεύθηκε ξανά στις λιπιδικές σχεδίες (**Εικ.38Α και Β**).

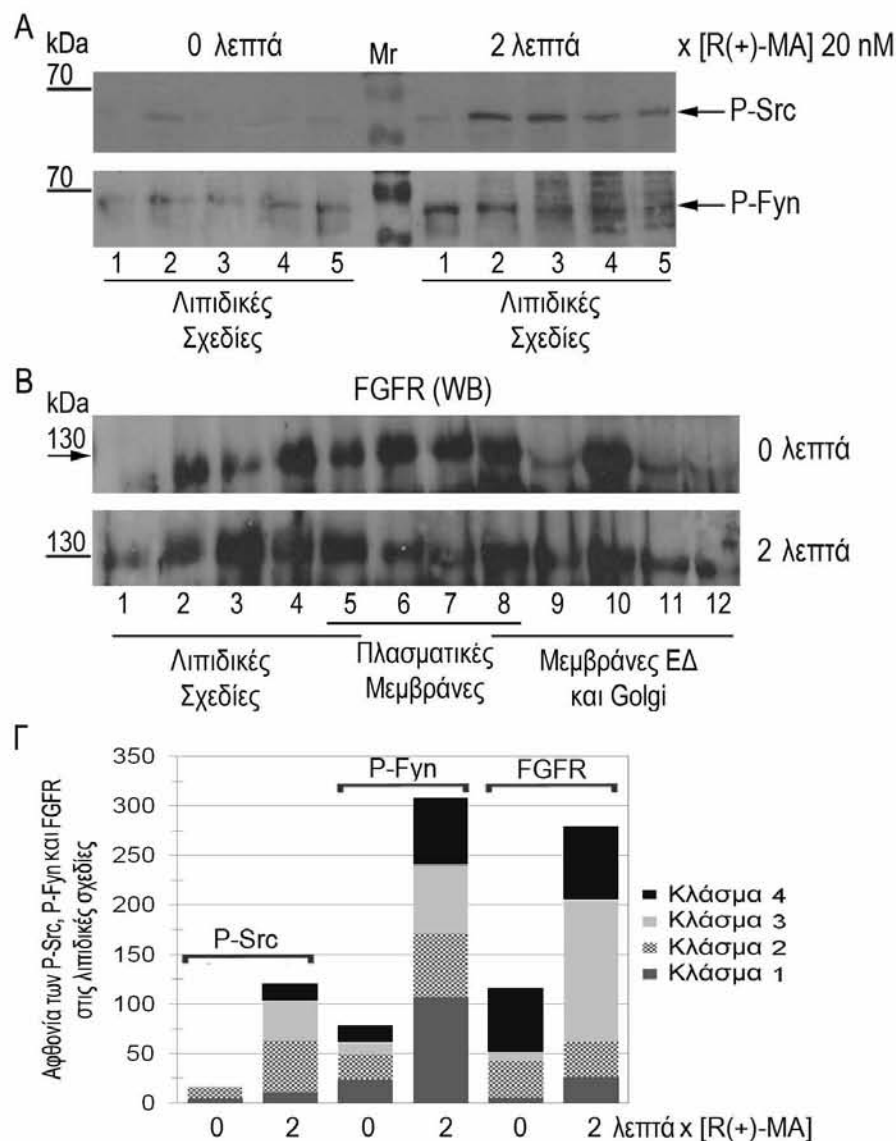




**Εικόνα 38. Εντοπισμός του CB1R και μετακίνησή του προς και εκτός των λιπιδικών σχεδίων σε πρωτογενείς νευρώνες.** Νευρώνες παρθένοι ή επωασμένοι με R(+)-MA (20 nM) για τις αναφερόμενες χρονικές περιόδους υποβλήθηκαν σε κλασμάτωση όπως περιγράφεται στις Μεθόδους. (Α) Τυπική ανάλυση ανοσοαποτύπωσης που απεικονίζει την αφθονία του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες (κλάσματα 1-4 ή 5), σε μεμβράνες μη σχεδίων (κλάσματα 5-8) και σε μεμβράνες ΕΔ και Golgi (κλάσματα 9-12). Ο CB1R επί τον ερεθισμό με R(+)-MA επιστρατεύθηκε άμεσα στις λιπιδικές σχεδίες, σταδιακά κινήθηκε προς τις ενδοκυττάρειες μεμβράνες για να καταλήξει στα 15 λεπτά στα φυσιολογικά επίπεδα. (Β) Πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες. Οι τιμές αποτελούν τη μέση τιμή ανοσοαντίδρασης του CB1R σε 5 δείγματα, ομαλοποιημένες με βάση το περιεχόμενο πρωτεΐνης (π.χ. η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο κλάσμα 1 είναι η μισή σε σχέση με αυτή του κλάσματος 4) (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

Προκειμένου να διερευνηθεί το εάν αυτή η προκαλούμενη από R(+)-MA επιστράτευση του CB1R στα κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων αποτελεί προαπαιτούμενο για την εγγύς μεταγωγή σήματος του CB1R και το σχηματισμό των συμπλόκων, εξετάστηκε το ενδεχόμενο οι κοντινές με το CB1R κινάσες να ενεργοποιούνται επίσης στις λιπιδικές σχεδίες. Πράγματι, φωσφορυλιωμένες, και

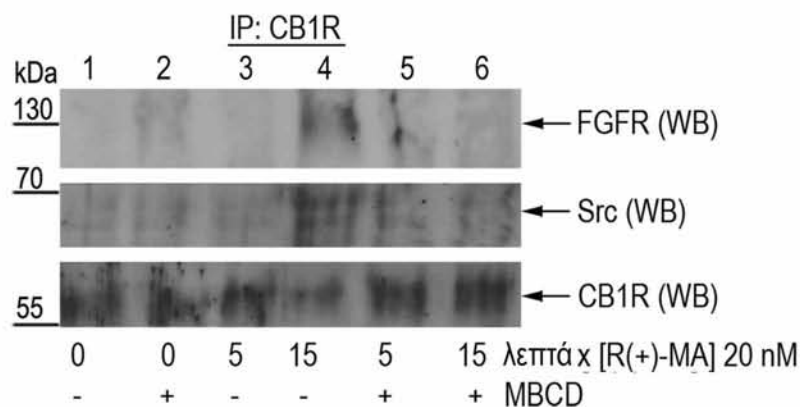
συνεπώς ενεργοποιημένες, μορφές των Src και Fyn κινασών ανιχνεύθηκαν στις λιπιδικές σχεδίες μέσα σε 2 λεπτά από την επώαση με R(+)-MA (**Εικ.39Α και Γ**). Παρόμοια, μόλις στα 2 λεπτά, η R(+)-MA προκάλεσε μετατόπιση μιας δεξαμενής FGFR στα κλάσματα των λιπιδικών σχεδιών (**Εικ.39Β και Γ**), υποδηλώνοντας, σε συνδυασμό με το αμέσως προηγούμενο εύρημα, ότι οι λιπιδικές σχεδίες είναι η περιοχή όπου ο CB1R, οι Src και Fyn κινάσες και ο FGFR αλληλεπιδρούν.



**Εικόνα 39.** Ταχεία επιστράτευση φωσφορυλιωμένων μορφών της Src και της Fyn, καθώς και κινητοποίηση του FGFR στις λιπιδικές σχεδίες, επαγόμενη από R(+)-MA. (Α) Τυπική ανάλυση ανοσοαποτύπωσης που απεικονίζει την αφθονία των P-Src και P-Fyn στις λιπιδικές σχεδίες (κλάσματα 1-5) και (Β) την υποκυτταρική κατανομή του FGFR, μετά από ερεθισμό με R(+)-MA (20 nM) για 2 λεπτά. (Γ) Πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας των P-Src, P-Fyn και FGFR στις λιπιδικές σχεδίες. Οι τιμές αποτελούν τη μέση τιμή ανοσοαντίδρασης των P-Src, P-Fyn και FGFR σε 2-5 δείγματα, ομαλοποιημένες με βάση το περιεχόμενο πρωτεΐνης (π.χ. η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο κλάσμα 1 είναι η μισή σε σχέση με αυτή του κλάσματος 4) (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].



Για να διαπιστώσουμε τη λειτουργική σημασία των παραπάνω παρατηρήσεων, προσδιορίστηκαν τα αποτελέσματα του MβCD διαταράκτη (disruptor) των λιπιδικών πλατφόρμων στον επαγόμενο από R(+)-MA σχηματισμό CB1R συμπλόκων. Τα ευρήματα αποκάλυψαν ότι ο σχηματισμός των CB1R-Src-FGFR συμπλόκων σαφώς προϋποθέτει την ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδίων, καθώς προεπώαση με MβCD (5 mM) μείωσε σημαντικά τη σύνδεση της Src (και της Fyn) και του FGFR με το CB1R (*Εικ.40*).



**Εικόνα 40.** Διατάραξη της ακεραιότητας των λιπιδικών σχεδίων μετά από δέσμευση της χοληστερόλης με MβCD προλαμβάνει το σχηματισμό των CB1R-Src-FGFR συμπλόκων. Ε7 πρωτογενείς νευρώνες επωάστηκαν με 20 nM R(+)-MA για τις αναφερόμενες χρονικές περιόδους, απουσία ή παρουσία MβCD (5 mM), και τα σύμπλοκα του CB1R με τη Src και τον FGFR ανιχνεύθηκαν μετά από ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των CB1R ανοσοκατακρημνίσεων με αντισώματα έναντι της Src και του FGFR· χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του CB1R για την εκτίμηση των επιπέδων του ανοσοκατακρημνισμένου υποδοχέα. Προεπώαση με MβCD μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από R(+)-MA αλληλεπίδραση του CB1R με τη Src και κατήργησε την επιστράτευση του FGFR (Asimaki et al., J Neurochem 2011) [296].

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την κριτικής σημασίας συμβολή των λιπιδικών σχεδίων στην εγγύτατη μεταγωγή σήματος του CB1R στους προερχόμενους από νεοσσό όρνιθας πρωτογενείς νευρώνες. Είναι σαφές ότι η κινητοποίηση και/ή η ενεργοποίηση των αλληλεπιδρουνών με το CB1R πρωτεϊνών στις λιπιδικές σχεδίες συνιστά ένα πρώιμο γεγονός που προηγείται του σχηματισμού λειτουργικών συμπλόκων και της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μορίων που βρίσκονται καθοδικά και οδηγούν σε ενεργοποίηση της ERK.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας προσπάθειας ήταν η σκιαγράφηση των μηχανισμών δράσης των κανναβινοειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μέσω της διερεύνησης του ρόλου της PKCε ισομορφής στα προκαλούμενα από κανναβινοειδή μνημονικά ελλείμματα, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, καθώς και σε οργανισμικό επίπεδο.

Προκειμένου να διερευνήσουμε σε *οργανισμικό* επίπεδο το ρόλο των υποδοχέων των κανναβινοειδών στη λειτουργική μνήμη και τον πιθανό συσχετισμό της ενεργοποίησής τους με τη δράση της PKC, σημαντικού συντελεστή στη νευρωνική διαφοροποίηση και τη λειτουργία της μνήμης, χρησιμοποιήσαμε ζωικά μοντέλα για να χαρτογραφήσουμε τις περιοχές του εγκεφάλου που αναπτύσσουν δευτερογενείς αλλαγές στο μεταβολισμό με χρήση ποζιτρονικής τομογραφίας (PET). Η μειωμένη χωρική διακριτική ικανότητα της συμβατικής ποζιτρονικής τομογραφίας δεν κατέστησε τη σάρωση PET ευαίσθητο εργαλείο για το συσχετισμό σε πραγματικό χρόνο των προκαλούμενων από κανναβινοειδή ελλειμάτων της λειτουργικής μνήμης με τη δράση της PKCε στον ιππόκαμπο επίμυ. Μετά τη χορήγηση κανναβινοειδών και την εκτέλεση δοκιμασιών αναγνώρισης αντικειμένων παρατηρήθηκαν αλλαγές της μεταβολικής δραστηριότητας του εγκεφάλου των επιμύων, όχι όμως τόσο διακριτές ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για την ενεργοποίηση των περιοχών που σχετίζονται με τη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Η δυνατότητα χρήσης microPET και SPECT ίσως θα μπορούσε να υπερκεράσει τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν με τη χρήση του PET σε μικρά ζώα και να καθορίσει ευκρινώς τη μεταβολική λειτουργία στον άθικτο οργανισμό.

Η σκιαγράφηση σε *μοριακό επίπεδο* των εγγύς σηματοδοτικών αλληλεπιδράσεων που οδηγούν σε ρύθμιση της PKC, ενεργοποίηση της ERK, και στη συνεπαγόμενη νευρωνική διαφοροποίηση μετά από ενεργοποίηση του CB1R υποδοχέα σε νευρώνες του ΚΝΣ, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως μοντέλο πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων προερχόμενες από τον τελεγκέφαλο νεοσσού όρνιθας 7<sup>ης</sup> εμβρυικής ημέρας (E7). Ένας μεγάλος αριθμός σημαντικών ευρημάτων προέκυψε από τις μελέτες μας που επιδεικνύουν ότι:

α. η εξαρτώμενη από το CB1R ενεργοποίηση της ERK είναι παρατεταμένη και διφασική,



β. ένας σημαντικός αριθμός (δεξαμενή) CB1R μορίων βρίσκεται προ-συνδεδεμένος με την PKCε, η οποία, αμέσως μετά την πρόσδεση του προσδέτη και την επακόλουθη οξεία ενεργοποίηση των  $G_{q/11}$  και της PLC, ενεργοποιείται και αποσυνδέεται από το CB1R,

γ. η ενεργοποιημένη PKCε άμεσα σχηματίζει παροδικά σηματοδοτικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένες μορφές της Src και της Fyn και επάγουν την πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK στα 5 λεπτά,

δ. μία δεύτερη δεξαμενή CB1Rs συνδέεται με την ενεργοποίηση των  $G_{i/o}$  και χρησιμοποιεί ως τελεστές επιπλέον μόρια Src και Fyn προκειμένου να δημιουργήσει ένα δεύτερο κύμα ενεργοποίησης της ERK στα 15 λεπτά,

ε. το δεύτερο κύμα ενεργοποίησης της ERK επάγεται από διενεργοποίηση του FGFR από το CB1R μέσω των PKCε και Src/Fyn κινασών,

στ. ο CB1R σχηματίζει πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα με τις Src και Fyn κινάσες και τον FGFR, και

ζ. ο CB1R αλληλεπιδρά με τις Src/Fyn και τον FGFR στις λιπιδικές σχεδίες, η ακεραιότητα των οποίων αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για το σχηματισμό των CB1R συμπλόκων.

Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν και από αντίστοιχες αναλύσεις σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος που υπερεκφράζουν σταθερά τον CB1 υποδοχέα (SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά), υποδηλώνοντας ότι παρόμοιοι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος από το CB1R χρησιμοποιούνται και από τα δύο νευρωνικά περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της ERK από το CB1R βρέθηκε και στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα να αποτελείται από δύο φάσεις και να μεσολαβείται από τις PKCε, Src και Fyn κινάσες και από διενεργοποίηση ενός RTK (του EGFR) μετά από αλληλεπίδρασή του με το CB1R στις λιπιδικές σχεδίες, όπως ακριβώς σημειώθηκε και στους πρωτογενείς νευρώνες. Σημαντικότερα, τα ευρήματα στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα οδήγησαν σε διεύρυνση των προερχόμενων από τους πρωτογενείς νευρώνες αποτελεσμάτων που αφορούν τα σηματοδοτικά γεγονότα που ενέχονται στην εξαρτώμενη από το CB1R ενεργοποίηση της ERK, και ειδικότερα, στον προσδιορισμό των μορίων που βρίσκονται καθοδικά του διενεργοποιούμενου από το CB1R RTK. Έτσι, αποκαλύφθηκε ότι, μέσω της ενεργοποίησης των κινασών τυροσίνης (Src, Fyn και RTK), η ενεργοποιούμενη από το CB1R PKCε προκαλεί διέγερση της Ras, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη Raf και, προφανώς

διαμέσου της ενεργοποίησης της MEK, επέρχεται φωσφορυλίωση του τελευταίου μέλους του μονοπατιού, δηλαδή της ERK.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων και τα κοινά σημεία της δράσης των κινασών ανάμεσα σε πρωτογενή κύτταρα είναι σημαντικά για την εξακρίβωση του ενιαίου τρόπου δράσης του συστήματος των κανναβινοειδών.

#### **4.1. Ο CB1 υποδοχέας επάγει διφασική ενεργοποίηση της ERK μέσω σχηματισμού πολυπρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων με τις εγγύς κινάσες PKCε, Src και Fyn**

Τόσο στους πρωτογενείς φλοιικούς νευρώνες όσο και στα SH-SH5Y-CB1R κύτταρα, ο επιλεκτικός αγωνιστής του CB1R υποδοχέα μεθανανδαμίδη (R(+)-MA) προκάλεσε φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση των ERK1/2 κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο, όπως έχει και προηγουμένως τεκμηριωθεί βιβλιογραφικά σε ινοβλάστες [299], τομές ιππόκαμπου [196], αστροκύττωμα [193], και νευροβλάστωμα [195] χρησιμοποιώντας διάφορα κανναβινοειδή. Εν τούτοις, το διφασικό μοντέλο της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK δεν είχε μέχρι τώρα εδραιωθεί.

Η εργασία αυτή ξεκίνησε με την παρατήρηση ότι η χρονική πορεία της ενεργοποίησης της ERK στη διάρκεια 60 λεπτών επέδειξε δύο διαδοχικές, προσθετικές αυξήσεις, εκ των οποίων η πρώτη παρουσιάστηκε στα 5 και η δεύτερη στα 15 λεπτά (**Εικ.14 και 24**). Το μέγεθος και η διάρκεια της ενεργοποίησης της ERK έχουν αιτιολογικά συνδεθεί με συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις σε νευρώνες και νευρικά κύτταρα, με την παροδική ενεργοποίηση (<10 λεπτά) να επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παρατεταμένη, ηπιότερη ενεργοποίηση να προκαλεί νευριτική επέκταση [223-224]. Συνεπώς, η παρατεταμένης διάρκειας ενεργοποίηση της ERK από το CB1R είναι σύμφωνη με την επαγωγή νευρωνικής διαφοροποίησης, η οποία και διαπιστώθηκε πειραματικά, αποκαλύπτοντας σημαντική αύξηση της επέκτασης του κύριου νευρίτη κατά 37,5% μετά από μακρόχρονη επώαση (48 ώρες) με R(+)-MA (**Εικ.12**).

Το χρονικό προφίλ της επαγόμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK είναι, επίσης, συνεπές και με την έντονη ενίσχυση ενός εγγύς σηματοδοτικού γεγονότος. Παραδείγματα ενεργοποίησης της ERK σε δύο φάσεις που ακολουθούν



δευτερογενώς τη δέσμευση ενός GPCR υπάρχουν, ωστόσο, στις περιπτώσεις αυτές οι δύο κορυφώσεις ενεργοποίησης απείχαν αρκετές ώρες [300-302]. Στην περίπτωση του CB1R, η διαδοχική διπλή κορύφωση έλαβε χώρα μέσα σε 15 λεπτά, υποδηλώνοντας ότι οι δύο διαφορετικές οδοί ενεργοποιήθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, η πρόσδεση κάποιων CB1 υποδοχέων στην R(+)-MA και η δέσμευση ενός συστήματος τελεστών θα μπορούσε να ευνοήσει την πρόσδεση μιας δεύτερης δεξαμενής υποδοχέων σε ένα διαφορετικό σύστημα τελεστών. Εναλλακτικά, οι δύο οδοί ίσως να ξεκινούν διαδοχικά και, μάλιστα, κάτω από το επίπεδο του προσδεμένου σε αγωνιστή υποδοχέα. Σε κάθε περίπτωση, όμως, και τα δύο συστήματα τελεστών "τροφοδοτούν" θετικά την ενεργοποίηση της ERK.

Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήσαμε αποκάλυψε ότι η ενεργοποίηση των PLC-PKC αποτελεί το πρωϊμότερο σηματοδοτικό γεγονός στον καταρράκτη CB1R-ERK. Καθώς και οι δύο κορυφώσεις της ενεργοποίησης της ERK αναστάλθηκαν άμεσα από τον ειδικό αναστολέα της PLC, U73122 (**Εικ.15**), έγινε φανερό ότι η ενεργοποίηση της PKC προϋποθέτει τη μεσολαβούμενη από  $G_{q/11}$  ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Μελέτες που διεξήχθησαν προηγουμένως από την ομάδα της Δρ. Μάγκουρα, αλλά και εργασίες άλλων ομάδων, έχουν δείξει ότι, στο εν λόγω νευρωνικό περιβάλλον, όπως και σε άλλους κυτταρικούς τύπους νευρικής προέλευσης, η PKC ενεργοποιείται άμεσα από GPCR ή RTK αγωνιστές και από την ενεργοποίηση της PLD ή PLC- $\beta$  ή  $\gamma$  προκειμένου να προβεί σε ενεργοποίηση της Ras/Raf ανοδικά της ενεργοποίησης της ERK [224,260,303,304]. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποίησης της ERK αποδεικνύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ταυτόχρονα έχει, επίσης, προταθεί συσσώρευση τριφωσφορικής ινοσιτόλης μετά από ενεργοποίηση της PLC από αγωνιστές του CB1R [147]. Η PLC, εκτός από τις  $G_{q/11}$ , πιθανά ακόμη να ενεργοποιείται από προκαλούμενη από τον αγωνιστή αποσύνδεση των Gβγ υπομονάδων [305], η οποία στην περίπτωση των κανναβινοειδών φαίνεται, τουλάχιστον σε κύτταρα νευροβλαστώματος, να εξαρτάται από τον αγωνιστή [147,306]. Στους πρωτογενείς νευρώνες νεοσσού όρνιθας, η δεύτερη, αλλά όχι η πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK από το CB1R μειώθηκε σημαντικά από τοξίνη του κοκκύτη (PTX) (**Εικ.15**), εύρημα το οποίο υποδεικνύει ότι η εμφανής ανάγκη για ενεργοποίηση των  $G_{i/o}$  προήλθε από μία διαφορετική δεξαμενή CB1R μορίων [142,147] από αυτούς που απευθείας συνδέθηκαν σε  $G_{q/11}$ . Συνεπώς, η επαγόμενη από το CB1R ενεργοποίηση της ERK εξαρτάται κατά πρώτη φάση από την ενεργοποίηση των  $G_{q/11}$  και ακολούθως των  $G_{i/o}$ .

Στη συνέχεια, μετά την παρατήρηση της άμεσης ενεργοποίησης των PLC-PKC από R(+)-MA στους πρωτογενείς νευρώνες, στόχος ήταν η εξακρίβωση της PKC ισομορφής που μετέχει στον CB1R-ERK καταρράκτη. Τα πειραματικά ευρήματα αποκάλυψαν την PKCε ως την PKC ισομορφή που ενεργοποιείται αμέσως με την ενεργοποίηση του CB1R (**Εικ.16**), επιδεικνύοντας απευθείας φωσφορυλίωση της PKCε επαγόμενη από R(+)-MA, γεγονός που καταργήθηκε από τον ειδικό πεπτιδικό αναστολέα της PKCε εV1-2. Ανάμεσα στις PKC ισομορφές, μονάχα η PKCε διαθέτει μία περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης [245], ιδιότητα που της επιτρέπει, μετά από ενεργοποίηση, να προσδένεται σε ινιδώδη ακτίνη (F-actin) και να επάγει τροποποίηση των πρωτεϊνών που βρίσκονται προσδεσμένες σε F-ακτίνη και, συνακόλουθα, νευριτική επέκταση [206,246]. Οι συνδεδεμένες με F-ακτίνη πρωτεΐνες, όπως το αποκλειστικό υπόστρωμα της PKC MARCKS, είναι θεμελιώδους σημασίας για την καθοδήγηση του αυξητικού κώνου σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, και παίζουν σημαντικό ρόλο μετά το σχηματισμό των συνάψεων στη συναπτική λειτουργία και, κατ' επέκταση, στο σχηματισμό της μνήμης [307-308]. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματά μας που δείχνουν άμεση ενεργοποίηση της MARCKS από το CB1R, η μεταγωγή σήματος από το CB1R στην PKCε, θα πρέπει να αναγνωρίζεται σαν ένα γεγονός εξαιρετικής σημασίας για τη ρύθμιση της νευριτικής ανάπτυξης από τα κανναβινοειδή σε νευρώνες του ΚΝΣ.

Ενώ διάφορες ερευνητικές προσπάθειες καθορισμού του μηχανισμού σύνδεσης του CB1R με την ενεργοποίηση της ERK έχουν επιδείξει διαφορεική σύζευξη στις υπομονάδες των G πρωτεϊνών και ενεργοποίηση της PKC, πιθανά εξαιτίας της χρήσης διαφορετικών αγωνιστών, αρκετές από αυτές συμφωνούν στην εξάρτηση του CB1R-ERK καταρράκτη από την ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης. Η ικανότητα των αναστολέων της οικογένειας των Src κινασών να καταργούν την επαγόμενη από CB1 υποδοχείς ενεργοποίηση της ERK και η προϋπόθεση ενεργοποίησης της Src για μέγιστη ενεργοποίηση της ERK είχαν προταθεί αρχικά [193-194] και, στη συνέχεια, η συμμετοχή των κινασών τυροσίνης επαληθεύτηκε περαιτέρω από την απώλεια της προκαλούμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK σε ποντίκια που είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο της Fyn (*Fyn<sup>-/-</sup> mice*) [196]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα δικά μας αποτελέσματα αποκάλυψαν αναστολή της ERK ενεργοποίησης από αναστολείς των Src κινασών (**Εικ.15 και 24**), και σημαντικότερα, μία έντονη και ειδική φωσφορυλίωση και συνεπώς ενεργοποίηση των Src και Fyn επαγόμενη από το R(+)-MA κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο, τόσο στους πρωτογενείς νευρώνες όσο και στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα (**Εικ.18 και 24**). Η λειτουργική σημασία της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της Src ή της Fyn είναι



εξαιρετικά σημαντική, όπως υποδεικνύουν τα ευρήματά μας, με πρώτο τη φωσφορυλίωση του Src και Fyn υποστρώματος p120 κατενίνη (**Εικ.19**). Η διαπίστωση ότι η εγγύς μεταγωγή σήματος του CB1R σε πρωτογενείς νευρώνες προκαλεί δραστική και οξεία τροποποίηση της p120 κατενίνης, μίας πρωτεΐνης που ρυθμίζει το μέγεθος των δενδριτικών ακανθών [309], ίσως είναι η απαρχή του προσδιορισμού του μηχανισμού με τον οποίο τα κανναβινοειδή μεσολαβούν στην τροποποίηση της συναπτικής διαβίβασης [π.χ. 60] . Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, περίοδοι υψηλής κινητικότητας των ακανθών συμπίπτουν με σχηματισμό συνάψεων και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση συνδέσεων με προσυναπτικά μόρια [310]. Τροποποίηση της p120 από CB1R πιθανά, λοιπόν, να ρυθμίζει το σχηματισμό ακανθών και, συνεπώς, τις συνδέσεις και τη συναπτική διαβίβαση κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ.

Δεύτερον, η PKCε είναι πιθανό να προηγείται της ενεργοποίησης μιας άλλης PKC ισομορφής, και όπως στην περίπτωση της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης της PKCδ, η Src να χρησιμεύει τόσο ως κινάση όσο και ως πρωτεΐνη ικρίωμα [311]. Πράγματι, ανιχνεύθηκε ενεργοποίηση μίας δεύτερης PKC ισομορφής που ακολουθεί την ενεργοποίηση της PKCε, και συγκεκριμένα της PKCζ ισομορφής στους πρωτογενείς νευρώνες και της PKCδ στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα (**Εικ.16Α,17 και 26**, αντίστοιχα), συνεπές με προηγούμενα ευρήματα ότι η PKCδ δεν εκφράζεται σε φλοιϊκούς νευρώνες νεοσσού όρνιθας [260]. Η ενεργοποίηση των PKC, Src ή Fyn συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της Raf και η συμμετοχή μιας δεύτερης PKC ισομορφής μπορεί να θεωρηθεί σαν μία ακόμη σηματοδοτική ανατροφοδότηση του CB1R στην ενεργοποίηση της ERK.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των Src και Fyn κινασών αναμενόταν να συνδέεται κυρίως με την ενεργοποίηση των ευαίσθητων σε PTX Gα<sub>i</sub> (άλλα όχι των β και γ), καθώς η Gα<sub>i</sub> υπομονάδα προσδένεται στην καταλυτική περιοχή της Src προκειμένου να ανοίξει η ενεργός περιοχή της κινάσης σε υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένης της Raf [184]. Λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία μόνο της δεύτερης φάσης της επαγόμενης από τον CB1R ενεργοποίησης της ERK στην PTX (**Εικ.15**), τα χρονικά πλαίσια της ενεργοποίησης της Src και της Fyn, και το μέγεθος της εξαρτώμενης από PTX αναστολής της ενεργοποίησης της Src (**Εικ.20**), τα παρουσιαζόμενα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός που δημιουργεί τη δεύτερη φάση κορύφωσης της ενεργοποίησης της ERK από το CB1R προϋποθέτει την ενεργοποίηση G<sub>i/o</sub> πρωτεϊνών συνδεδεμένων με GTP. Εξαιτίας της δομής τους, η ενεργοποίηση των Src και Fyn κινασών τους προσδίδει την ιδιότητα να είναι επαρκείς ώστε να μεσολαβούν

στη διενεργοποίηση υποδοχέων κινασών τυροσίνης (RTKs) [298]. Τα τελευταία χρόνια, η διενεργοποίηση των RTKs αντιμετωπίζεται ως ένας κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου οι GPCRs, συμπεριλαμβανομένου του CB1R [195,200], χρησιμοποιούν απουσία αυξητικού παράγοντα τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων με δράση τυροσίνης προκειμένου να επάγουν ενεργοποίηση της ERK και να μεσολαβήσουν στις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις τους.

Εν συνεχεία, ως επακόλουθο της ενεργοποίησης των CB1R και GPLC, ανιχνεύθηκε ότι η PKCε συνδέεται άμεσα και πιθανά ενεργοποιεί τις Src και Fyn στους πρωτογενείς νευρώνες και στην SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά (**Εικ.23 και 25**). Αλληλεπιδράσεις της ρυθμιστικής περιοχής της PKCε με τη Src περιλαμβάνουν πολλαπλές SH2 και SH3 περιοχές της Src, και διευκολύνονται από μία "ανοιχτή" και συνδεδεμένη με τη μεμβράνη (ενεργοποιημένη) στερεοδιαμόρφωση της PKCε [294]. Τέτοιες συνδέσεις έχει δείχθει να επαρκούν για την επαγωγή ενεργοποίησης της κινάσης Lck της οικογένειας Src από την PKCε [294]. Καθώς ο επιλεκτικός για την PKCε πεπτιδικός αναστολέας εV1-2 βρέθηκε να καταργεί τόσο την προκαλούμενη από R(+)-MA ενεργοποίηση της Fyn (**Εικ.20**) όσο και το σχηματισμό PKCε και P-Src/P-Fyn συμπλόκων (**Εικ.23**), οι συνδέσεις αυτές φαίνεται να εξαρτώνται από τη δραστηριότητα της PKCε. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει για πρώτη φορά ότι η ενεργοποιούμενη από GPCR PKCε μπορεί απευθείας να αλληλεπιδρά με τη Src και τη Fyn. Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα ευρήματα, αναφορικά με το CB1R, δύο οδοί σηματοδότησης, δηλαδή η  $G_q$ /PLC/PKC/Src και η  $G_{i/o}$ -Src, μαζί με πιθανές θετικές ανατροφοδοτήσεις από τη  $G_{\beta\gamma}$ /PLC/PKC/Src και Src/RTK/PLC- $\gamma$ /PKC/Src, συγκλίνουν κατά τρόπο συντονισμένο στην ενεργοποίηση των Ras, Raf (**Εικ.27**) και, στη συνέχεια, των ERK1/2.

Τα αποτελέσματά μας επίσης αποκάλυψαν μία προηγουμένως άγνωστη σύνδεση του CB1R με την PKCε σε φυσιολογικές συνθήκες στους πρωτογενείς νευρώνες (**Εικ.21**), καθώς δείχνουν ότι σχεδόν οι μισοί από τους CB1Rs συνήρθαν με την ανοσοκατακρημνισμένη PKCε. Για την αποσύνδεση των δύο μορίων είναι αναγκαίες αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσής τους. Πρόσδεση του προσδέτη προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του CB1R [17], ενώ η προερχόμενη από PLC-DAG ενεργοποίηση, καθώς επίσης φαίνεται και με το ψεRACK, επάγει την ανοιχτή στερεοδιαμόρφωση της PKCε [294]. Η προηγούμενη παρατήρηση εξηγεί την αποσύνδεση της PKCε από τον CB1R που παρατηρείται μετά από ερεθισμό με R(+)-MA. Η άμεση αλληλεπίδραση CB1R-PKCε μεσολαβείται από τη ρυθμιστική περιοχή της PKCε, ενώ καμία αλληλεπίδραση δεν ανιχνεύθηκε όταν ο CB1R συν-



διαμολύνθηκε με την καταλυτική περιοχή της PKCε (**Εικ.22**). Μελλοντικές μελέτες στοχεύουν προς τον προσδιορισμό των υποπεριοχών που είναι υπεύθυνες για αυτήν την αλληλεπίδραση.

Ο CB1R φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στις ενδοκυττάρειες περιοχές του προκειμένου να διευκολυνθούν οι αλληλεπιδράσεις του με την ενδοκύτωση [285,312]. Με αφορμή τα αποτελέσματά μας και την υψηλή έκφραση τόσο της PKCε όσο και του CB1R στους νευρώνες, δεν είναι παράτολμο να υποτεθεί ότι το εδραιωμένο ποσοστό της θεμελιωμένης ενδοκύτωσης των CB1 υποδοχέων αντανάκλα αυτή την αλληλεπίδραση. Τα ευρήματα που προηγήθηκαν ίσως δίνουν, επίσης, μια εξήγηση για την αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης του WIN55,212-2 αγωνιστή στο CB1 υποδοχέα σε ένα περιβάλλον PKCε<sup>-/-</sup>, όπου η παρατηρούμενη ρύθμιση της συμπεριφοριστικής ευαισθησίας σε ερεθισμό δεν ήταν εξαιτίας τροποποίησης των G πρωτεϊνών και αλληλεπιδράσεων του CB1R, αλλά ούτε και φωσφορυλίωση του CB1R ανιχνεύθηκε [304]. Η κοιλότητα πρόσδεσης (binding pocket) του συγκεκριμένου αγωνιστή μέσα στις διαμεμβρανικές έλικες του CB1R [27] ίσως απαιτεί στη θέση αυτού, την πρόσδεση του υποδοχέα στην PKCε για τη ρύθμισή του.

Στο κεφάλαιο αυτό συζητήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο η ενεργοποίηση του CB1R προκαλεί αποσύνδεσή του από την PKCε, προκειμένου η τελευταία να αλληλεπιδράσει άμεσα με τις Src και Fyn κινάσες και μέσω ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσής τους να επάγει φωσφορυλίωση των Ras και Raf, και μετέπειτα ενεργοποίηση της ERK. Η οδός G<sub>q</sub>/PLC/PKCε βρέθηκε να ρυθμίζει την πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK, ενώ η G<sub>i/o</sub>/Src συνδέθηκε με τη δεύτερη. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί συζητείται η διενεργοποίηση υποδοχέων κινασών τυροσίνης από το CB1R που προσδίδει θετική ανατροφοδότηση στη μεταγωγή σήματος από το CB1R και επάγει ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK.

#### 4.2. Η εξαρτώμενη από τον CB1R διενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTK) πηγάζει από τις λιπιδικές σχεδίες και επάγει ενίσχυση της ενεργοποίησης της ERK1/2

Καθώς η διενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) αποτελεί σημείο-κλειδί της MAPK ενεργοποίησης από υποδοχείς συζευγμένους τόσο με  $G_i$  όσο και με  $G_{q/11}$  πρωτεΐνες, ήταν εύλογο να μελετηθεί η συμμετοχή τους στον CB1R-ERK καταρράκτη. Το χρονικό προφίλ της ενεργοποίησης της ERK από το CB1R που παρουσιάστηκε προηγουμένως καταδεικνύει μία οξεία αύξηση στα 5 λεπτά, ενίσχυση της ενεργοποίησης στα 15 λεπτά που διατηρείται μέχρι τα 30 λεπτά, και μία σταδιακή μείωση αμέσως μετά. Το μέγεθος της έντασης της δεύτερης αύξησης της ενεργοποίησης της ERK, σε συνδυασμό με τη διαφορική εξάρτηση των δύο φάσεων ενεργοποίησης από τη φαρμακολογική αναστολή των G πρωτεϊνών και των εγγύς πρωτεϊνών Src και Fyn, οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως ένας RTK συμμετέχει στην ανατροφοδότηση της μεταγωγής σήματος από το CB1R.

Προκαταρκτικά πειράματα στην SH-SY5Y-CB1R κυτταρική σειρά αποκάλυψαν διενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) τόσο μέσω της κατάργησης της επαγόμενης από το CB1R ενεργοποίησης των Ras και ERK μετά από αναστολή του EGFR με AG1478, όσο και μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης/διαενεργοποίησής του από R(+)-MA (**Εικ.28 και 29**). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν σαφώς τη μεσολάβηση του EGFR και τη χρησιμοποίησή του από το CB1R για την επαγωγή της ενεργοποίησης της Ras και κατ' επέκταση της ERK στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα. Προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες, αν και είχαν δείξει αναστολή της επαγόμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK από AG1478, δεν είχαν ωστόσο ανιχνεύσει απευθείας ενεργοποίηση του EGFR από κανναβινοειδή σε αστροκύττωμα [193]. Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι η διενεργοποίηση του EGFR είναι εξαρτώμενη από τον τύπο του αγωνιστή και την κυτταρική σειρά. Πράγματι, ακόλουθες μελέτες παρουσίασαν ευρήματα που βρίσκονται σε συμφωνία με τα δικά μας και, συγκεκριμένα, κατέδειξαν διενεργοποίηση του EGFR από το CB1R σε διάφορες καρκινικές σειρές [200].

Λαμβάνοντας υπόψη την αφθονία των CB1Rs και των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFRs) στους φλοιϊκούς νευρώνες προερχόμενους από νεοσσό όρνιθας (**Εικ.31**), καθώς επίσης και την εδραιωμένη διασταυρούμενη επικοινωνία ανάμεσα στο CB1R και τον FGFR σε νευρώνες επίμυ [210], προσδιορίσαμε τη διενεργοποίηση του FGFR από το CB1R σε πρωτογενείς



νευρώνες (**Εικ.32 και 34**). Σημαντικότερα, αποκαλύψαμε τη μεσολάβηση του FGFR στη δεύτερη κορύφωση της ERK ενεργοποίησης, καθώς αναστολή του με τον PD173074 ειδικό αναστολέα του FGFR απέτρεψε τη δεύτερη και όχι την πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK από το CB1R. Επιπλέον και η χρονική πορεία της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης του FGFR από το CB1R κατέδειξε ότι η κορύφωσή της (7-15 λεπτά) συμπίπτει χρονικά με το δεύτερο κύμα ενεργοποίησης της ERK. Οι FGFR υποδοχείς δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με την Grb2 πρωτεΐνη αλλά χρησιμοποιούν τις ενδιάμεσες φωσφοπρωτεΐνες FRS2 και 3 ως επιπλέον προσαρμογείς/ικριώματα [217,313]. Έτσι, με την ενεργοποίηση του FGFR και την άμεση τυροσινική φωσφορυλίωση των FRS2/3, επιστρατεύεται η Grb2 η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση του καταρράκτη των ERK1/2, λειτουργία μοναδική στα σπονδυλωτά και μη υπάρχουσα σε όλους τους RTKs. Η λειτουργική σημασία αυτής της εμφανούς διασταυρούμενης επικοινωνίας μεταξύ CB1R και FGFR διαπιστώθηκε, όταν ο PD173074 αναστολέας του FGFR κατήργησε ολοκληρωτικά την εξαρτώμενη από το CB1 υποδοχέα αύξηση του μήκους του κύριου δενδρίτη στους E7 πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες (**Εικ.33**).

Η διενεργοποίηση του FGFR εντοπίστηκε τοποθετημένη καθοδικά της ενεργοποίησης της PKCε από το CB1R, η οποία, όπως δείχθηκε προηγουμένως, ενεργοποιεί με τη σειρά της τις Src και Fyn κινάσες τυροσίνης που μέσω διαμοριακών φωσφορυλίσεων είναι πιθανό να ενεργοποιούν τον FGFR [298]. Πράγματι, η ενεργοποίηση των PKCε και Src/Fyn κινάσων αποδείχθηκε αναγκαία προϋπόθεση για την επαγόμενη από κανναβινοειδή διενεργοποίηση του FGFR (**Εικ.35**) και τη συμμετοχή του στη δεύτερη ενίσχυση της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK. Επιπλέον της επιστράτευσης των FRS2/3, ο FGFR πιθανά να επάγει ενεργοποίηση των ERK1/2 μέσω της PLC-γ [313], καθώς τα δύο μόρια συνδέονται για την ενεργοποίηση της PLC-γ, και την επακόλουθη υδρόλυση της φωσφατιδυλινοσιτόλης, παραγωγή DAG και την ενεργοποίηση της PKC. Αυτός ίσως να είναι ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο ο FGFR ελέγχει το δεύτερο κύμα της προκαλούμενης από το CB1R ενίσχυσης της ενεργοποίησης της ERK. Επιπροσθέτως, καθώς η ERK φωσφορυλιώνει την FRS2 επιδρώντας αρνητικά στην επαγόμενη από τον FGF φωσφορυλίωση της FRS2 σε τυροσίνη [217], η χρησιμοποίηση του FGFR ίσως εξυπηρετεί επιπλέον και μηχανισμούς τερματισμού του σηματοδοτικού καταρράκτη από τον CB1R.

Η επαγόμενη από GPCR διενεργοποίηση των RTKs συνήθως περιλαμβάνει το σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που αποτελούν εγγύς ολοκληρωτές

(proximity integrators) της σηματοδότησης και των δύο αυτών τύπων υποδοχέων. Όπως στο παράδειγμα του βAR και του EGFR, τα σύμπλοκα αυτά σχηματίζονται σε μία δεύτερη φάση της μεταγωγής του σήματος προκειμένου να επάγουν καθοδικά μέγιστη ενεργοποίηση της ERK1/2 [213]. Τα ευρήματά μας αποκάλυψαν ότι ο CB1R σχηματίζει πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα με τις Src/Fyn και τον FGFR, και, μάλιστα, ο σχηματισμός τους εξαρτάται από την ενεργοποίησή τους καθώς και από την ενεργοποίηση της PKCε (**Εικ.36 και 37**).

Οι CB1Rs ενδέχεται να σχηματίζουν ομότυπα ή ακόμη και ετερότυπα διμερή με άλλους GPCRs προκειμένου να επάγουν ενίσχυση της σηματοδότησης αλλά και εσωτερίκευση του υποδοχέα [312]. Τα ευκρινώς διαφορετικά ετερότυπα σύμπλοκα των GPCRs και RTKs παραμένουν, ωστόσο, λιγότερο κατανοητά και χαρακτηρισμένα, με εξαίρεση το γεγονός ότι προϋποθέτουν πρωτεΐνες ικρίωματα [213,215]. Σε αυτό το σύμπλοκο CB1R-κινάση τυροσίνης (TK)-FGFR, οι Src και Fyn κινάσες, αν και απαραίτητες για το σχηματισμό του, είναι απίθανο να δρουν σε βασικό ικρίωμα. Από την άλλη, άλλες πρωτεΐνες όπως οι β-αρρεσίνες [314], πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η κινάση εστιών προσκόλλησης (FAK) [206,315], καθώς επίσης και οι ρυθμιστές σηματοδότησης των G πρωτεϊνών (RGS πρωτεΐνες) [316], ή, ακόμη πιθανότερα, οι FRS2/3 [217], ίσως έχουν σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση και την υποκυτταρική μετακίνηση του συμπλόκου CB1R-TK-FGFR. Καθώς το ενδιαφέρον εύρημα της συνύπαρξης ενός GPCR και ενός RTK σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο πιθανά να αντανάκλα τόσο γεγονότα σηματοδότησης όσο και ενδοκύτωσης, διερευνήσαμε τις υποκυτταρικές περιοχές στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι εν λόγω αλληλεπιδράσεις.

Για τη μεταγωγή σήματος του CB1R έχει βρεθεί ότι ο διαταράκτης (disruptor) των λιπιδικών πλατφόρμων MβCD διπλασιάζει την ικανότητα πρόσδεσης του υποδοχέα στα κανναβινοειδή και οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση της ενεργοποίησης της ERK, ωστόσο, όμως, ο εντοπισμός του CB1R σε νευρωνικό περιβάλλον δεν έχειδειχθεί. Ανάλυση της υποκυτταρικής κατανομής του CB1R στα SH-SY5Y-CB1R κύτταρα, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλο απομόνωσης λιπιδικών σχεδίων απουσία απορρυπαντικού, αποκάλυψε επιστράτευση του CB1R και του EGFR στις λιπιδικές σχεδίες μετά από επώαση με κανναβινοειδή (**Εικ.30**). Διεξοδικότερη ανάλυση του υποκυτταρικού εντοπισμού του CB1R σε E7 πρωτογενείς νευρώνες επέδειξε ότι ο υποδοχέας σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται κυρίως σε μεμβράνες μη σχεδίων και λιγότερο στις λιπιδικές σχεδίες. Ερεθισμός με R(+)-MA για 2 λεπτά προκαλεί ταχεία ανακατανομή του CB1R στις λιπιδικές σχεδίες, υποδηλώνοντας ότι τα πρώιμα



γεγονότα της μεταγωγής σήματος του CB1R πιθανά συμβαίνουν στην περιοχή αυτή. Παρατεταμένη ενεργοποίηση του CB1R για 7 λεπτά φανερώνει απομάκρυνσή του από τις λιπιδικές σχεδίες για να επανέλθει ξανά μετά τα 15 λεπτά, οπότε και ενδεχομένως λαμβάνει χώρα ανακύκλωσή του (**Εικ.38**). Οι CB1Rs προσδένονται σε λιπιδικά μόρια και, τουλάχιστον για τον ενδογενή αγωνιστή ανανδαμίδη, η χοληστερόλη είναι θεμελιώδους σημασίας για την είσοδό του στις λιπιδικές διπλοστιβάδες της πλασματικής μεμβράνης [317]. Είναι επομένως πιθανό ότι η πρόσδεση του προσδέτη επάγει αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του CB1R, επιτρέποντας την αυξημένη του ροή προς τις λιπιδικές σχεδίες και τη σύνδεσή του με σηματοδοτικές πρωτεΐνες που έχουν την τάση να συσσωρεύονται στις λιπιδικές σχεδίες, όπως η Src.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ενεργοποιημένες μορφές της Src και της Fyn, όπως και ο FGFR, ανιχνεύθηκαν στις λιπιδικές σχεδίες μετά από σύντομη ενεργοποίηση του CB1R (2 λεπτά) (**Εικ.39**), υποδεικνύοντας ότι οι λιπιδικές σχεδίες είναι η περιοχή όπου οι CB1R, Src/Fyn και FGFR αλληλεπιδρούν. Ο FGFR1 κατά κύριο λόγο, ίσως, να μεταδίδει το σήμα από μεμβράνες μη λιπιδικών σχεδιών, τουλάχιστον όταν πρόκειται για μιτογόνα σήματα [217,313], εν τούτοις αυτή είναι η πρώτη φορά όπου ο FGFR1 ανιχνεύεται σε λιπιδικές σχεδίες χωρίς κανένα απορρυπαντικό και, μάλιστα, απουσία FGF. Επιπλέον, η άμεση ανίχνευση του FGFR στα κλάσματα που περιέχουν λιπιδικές σχεδίες αποκλείει μία επαγόμενη από CB1R ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών και απελευθέρωση FGF. Λαμβάνοντας επίσης υπόψη τη σημαντική κατανομή των FRS2 και FRS3 στις λιπιδικές σχεδίες [217], καθώς και το ήπιο μέγεθος της εξαρτώμενης από το CB1R ενεργοποίησης της ERK, τα ευρήματά μας πιθανά να αντανakλούν το μηχανισμό της διενεργοποίησης του FGFR από τους GPCRs. Η ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδιών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό των CB1R-Src-FGFR συμπλόκων (**Εικ.40**), προσδίδοντας λειτουργική χροιά στις παρατηρήσεις αυτές.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν άμεση απόδειξη ότι οι λιπιδικές σχεδίες συνιστούν την πλατφόρμα της πλασματικής μεμβράνης στην οποία τόσο τα πρώιμα γεγονότα της μεταγωγής σήματος του CB1R, όσο και ο επακόλουθος σχηματισμός συμπλόκων με τις κινάσες τυροσίνης και τον FGFR προς την ενεργοποίηση της ERK και την νευρωνική διαφοροποίηση, ιεραρχούνται και οργανώνονται.

Συμπερασματικά λοιπόν, στην παρούσα μελέτη αποσαφηνίστηκαν άγνωστες έως τώρα πτυχές του μηχανισμού μεταγωγής σήματος του CB1 υποδοχέα σε νευρώνες του ΚΝΣ που σχετίζεται άμεσα με τη νευρωνική διαφοροποίηση και τη νευρωνική λειτουργία, τους μηχανισμούς, δηλαδή, που συντελούν στη διαμόρφωση της μνήμης. Μελετώντας μόρια εκφραζόμενα ενδογενώς στη φυσική τους στοιχειομετρία, προσδιορίστηκε για πρώτη φορά μία βήμα-προς-βήμα σηματοδοτική πορεία μεταγωγής σήματος από το CB1 υποδοχέα, όπου η αρχική ενεργοποίηση της PKCε από το CB1R και η μετέπειτα ενεργοποίηση των Src και Fyn κινασών καθοδηγούν τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του FGFR, και ακολούθως την ενεργοποίηση των Ras, Raf και ERK1/2. Οι διαμοριακές αυτές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα τροποποιούμενα από λιπίδια μόρια που φαίνεται να μετακινούνται από και προς τις λιπιδικές σχεδίες, εξαρτώνται άμεσα από το σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι θεμελιώδους σημασίας όχι μόνο για την παραγωγή νέας γνώσης για τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες που τροποποιούνται από την επαγόμενη από τα κανναβινοειδή ενεργοποίηση της PKCε και της ERK, αλλά και για την κατανόηση των λιγότερο χαρακτηρισμένων μέχρι σήμερα οξειών επιδράσεων της κάνναβης.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι μηχανισμοί ρύθμισης και τροποποίησης των σημαντικών για τη συναπτική πλαστικότητα και μνήμη PKCε και ERK1/2 από τον CB1 υποδοχέα των κανναβινοειδών στο ΚΝΣ. Η μειωμένη ευαισθησία και χωρική διακριτική ικανότητα της συμβατικής ποζιτρονικής τομογραφίας δεν επέτρεψε το συσχέτισμό σε πραγματικό χρόνο των δευτερογενών αλλαγών του μεταβολισμού που προκαλούνται από τα κανναβινοειδή με τη δράση της PKCε στις υπεύθυνες για τη λειτουργική μνήμη εγκεφαλικές περιοχές του επίμου. Από την άλλη, σε νευρωνικό κυτταρικό περιβάλλον προέκυψε μια σειρά από σημαντικά ευρήματα που αφορούν τους μοριακούς μηχανισμούς μετάδοσης σήματος από τον CB1R. Η ενεργοποίηση του CB1R υποδοχέα με μεθανανδαμίδα αποκάλυψε ενεργοποίηση της ERK σε δύο φάσεις, μία στα 5 λεπτά και μία παρατεταμένη στα 15 λεπτά σε πρωτογενείς νευρώνες φλοιού νεοσσού όρνιθας (E7CH). Οι E7CH νευρώνες βρέθηκαν να εκφράζουν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα CB1Rs, η πλειονότητα των οποίων δείχθηκε για πρώτη φορά να συνδέεται με την PKCε υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας δείχνουν ότι στην πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK από τον CB1R μεσολαβεί διαδοχική ενεργοποίηση των  $G_q$ , PLC και της PKCε, και ότι η ενεργοποιημένη από τον CB1R PKCε αποσυνδέεται από τον υποδοχέα προκειμένου να σχηματίσει παροδικά σύμπλοκα σηματοδότησης με τις ενεργοποιημένες Src και Fyn κινάσες. Μία δεύτερη δεξαμενή CB1Rs συνδέεται με την ενεργοποίηση των  $G_{i/o}$  πρωτεϊνών και χρησιμοποιεί ως τελεστές επιπλέον μόρια Src και Fyn για να επάγει το δεύτερο κύμα της ενεργοποίησης της ERK στα 15 λεπτά. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε διενεργοποίηση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR) από τον CB1R μέσω των Src και Fyn που βρέθηκε να συνδέεται με τη δεύτερη φάση της ERK ενεργοποίησης. Η διενεργοποίηση του FGFR συνοδεύεται από το σχηματισμό εξαρτώμενων από την PKCε πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που περιλαμβάνουν τον CB1R, τη Fyn, τη Src και τον FGFR. Η στρατολόγηση των μορίων στα σύμπλοκα βρέθηκε να αυξάνεται με το χρόνο έκθεσης στον αγωνιστή, υποδηλώνοντας ότι, επιπλέον της σηματοδότησης, τα συγκροτούμενα σύμπλοκα εξυπηρετούν και την ενδοκυττάρια κυκλοφορία των υποδοχέων. Μετά από ενεργοποίηση με μεθανανδαμίδα ανιχνεύσαμε, επίσης, μια ταχεία επιστράτευση του CB1R, καθώς και των ενεργοποιημένων μορφών της Src και Fyn, και του FGFR στις λιπιδικές σχεδίες, η ακεραιότητα των οποίων αποτελεί προϋπόθεση για το σχηματισμό του συμπλόκου. Τα αποτελέσματά μας μαρτυρούν, συνεπώς, για πρώτη φορά ότι η οδός  $G_q$ /PLC/PKCε ρυθμίζει την πρώτη φάση ενεργοποίησης της ERK, ενώ η  $G_{i/o}$ /Src/RTK οδός επάγει τη δεύτερη ενίσχυση της ERK ενεργοποίησης μέσω της οργάνωσης στις λιπιδικές πλατφόρμες των εγγύς γεγονότων σηματοδότησης του CB1R, δηλαδή της ενεργοποίησης της Src και της Fyn, και της διενεργοποίησης του FGFR, οδηγώντας σε νευρωνική διαφοροποίηση.

## SUMMARY

The present study deals with the investigation of the molecular mechanisms involved in the regulation and activation of the important for synaptic plasticity and memory Protein Kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) and extracellular signal-regulated kinases ERK1/2 by Cannabinoid Receptors 1 (CB1Rs). The limited resolution and sensitivity of the conventional positron emission tomography (PET) precluded the use of PET in correlating in vivo the cannabinoid-dependent regional metabolic changes with PKC $\epsilon$  activity in specific brain areas of rat, such as hippocampus. On the other hand, the study of CB1R proximal signaling in a neuronal cellular context revealed a number of important findings. At first, we presented evidence that the CB1R agonist methanandamide induces a biphasic and sustained activation of ERK1/2 in primary neurons derived from E7 chick embryo telencephalon. We showed that E7 neurons natively express high levels of CB1R message and protein, the majority of which associates with PKC $\epsilon$  at basal conditions. We demonstrated that the first peak of ERK activation by CB1R is mediated by the sequential activation of Gq, PLC, and PKC $\epsilon$ , selectively, and that the CB1R-activated PKC $\epsilon$  acutely forms transient signaling modules containing activated Src and Fyn. A second pool of CB1Rs, coupled to PTX-sensitive activation of Gi/o, utilizes as effectors additional Src and Fyn molecules to generate a second, additional wave of ERK activation at 15 min. Most importantly, further analysis revealed tyrosine phosphorylation and transactivation of fibroblast growth factor receptor (FGFR)1 by CB1R via Src and Fyn, which drives the second amplification wave in ERK1/2 activation. Transactivation of FGFR1 is accompanied by the formation of a protein kinase C  $\epsilon$ -dependent multiprotein complex that includes CB1R, Fyn, Src, and FGFR1. Recruitment of molecules increases with time of exposure to methanandamide, suggesting that it also serves trafficking of receptors. Upon agonist stimulation we also detected a rapid incorporation of CB1R, as well as activated Src and Fyn, and FGFR1 in lipid rafts. Most importantly, lipid raft integrity appeared to be a prerequisite for CB1R-dependent complex formation. Summarizing, when CB1R is concerned, two pathways, namely G<sub>q</sub>/PLC/PKC $\epsilon$  and G<sub>i/o</sub>/Src/RTK, regulate the first and the second amplification of ERK signal, respectively, and lipid rafts organize CB1 receptor proximal signaling events, namely activation of Src and Fyn, and transactivation of FGFR1 towards activation of ERK1/2 and induction of neuronal differentiation. Our data provide the first evidence for multiprotein signaling complex formation in the coupling of CB1R to activation of ERK in CNS neurons, and may elucidate several of the less understood acute effects of cannabinoid drugs.



---

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Creighton C. On Indications of the Hachish-Vice in the Old Testament, *Janus: Archives internationales pour l'histoire de la medecine et pour la geographie medicale*, 1903;297-303.
2. Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, del Bianco F, et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot* 2008;59(15):4171-82.
3. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S163-71.
4. Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 2001;178:101-6.
5. Mechoulam R, Gaoni Y. A Total Synthesis of DI-Delta-1 Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 1965;87:3273-5.
6. Brunton LL, Parker KL, Blumenthal DK, Buxton ILO. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology & Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 2007;397
7. Consroe P, Mechoulam R. Anticonvulsant and neurotoxic effects of tetrahydrocannabinol stereoisomers. *NIDA Res Monogr* 1987;79:59-66.
8. Bornheim LM, Correia MA. Effect of cannabidiol on cytochrome P-450 isozymes. *Biochem Pharmacol* 1989;38(17):2789-94.
9. Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA. The effect of cannabidiol on mouse hepatic microsomal cytochrome P450-dependent anandamide metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197(2):740-6.
10. Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA. Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol* 1995;50(5):677-86.
11. Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreacos E, Mechoulam R, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9561-6.
12. Cahn RS. Cannabis indica resin, Part III. The constitution of cannabinol. *J Chem Soc* 1932;1342-1353.
13. Adams R et al. Structure of cannabinol. III Synthesis of cannabinol, 1-hydroxy-3-n-amy-6,6,9-trimethyl-dibenzopyran. *J Am Chem Soc* 1940;62:2204-2207.
14. Mechoulam R, Gaoni V. CBD, Synthesis. *J Am Chem Soc* 1965;87:3273.

15. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(3):1375-87.
16. McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6(11):2921-7.
17. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):161-202.
18. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995;48(3):443-50.
19. Rhee MH, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, et al. Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylylcyclase. *J Med Chem* 1997;40(20):3228-33.
20. Thomas A, Stevenson LA, Wease KN, Price MR, Baillie G, Ross RA, et al. Evidence that the plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2005;146(7):917-26.
21. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001;134(4):845-52.
22. Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, et al. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(1):363-70.
23. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, et al. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 1999;42(4):769-76.
24. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346(6284):561-4.
25. Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991;279(Pt 1):129-34.
26. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365(6441):61-5.
27. McAllister SD, Rizvi G, Anavi-Goffer S, Hurst DP, Barnett-Norris J, Lynch DL, et al. An aromatic microdomain at the cannabinoid CB(1) receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *J Med Chem* 2003;46(24):5139-52.



28. Ulfers AL, McMurry JL, Kendall DA, Mierke DF. Structure of the third intracellular loop of the human cannabinoid 1 receptor. *Biochemistry* 2002;41(38):11344-50.
29. Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):14136-41.
30. McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol* 2008;73(2):441-50.
31. Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001;60(1):155-63.
32. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(1):1-4.
33. D'Souza DC, Kosten TR. Cannabinoid antagonists: a treatment in search of an illness. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58(4):330-1.
34. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258(5090):1946-9.
35. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50(1):83-90.
36. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(7):3662-5.
37. Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskey NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 2000;351 Pt 3:817-24.
38. Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 1993;46(5):791-6.
39. Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, et al. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem* 1994;37(12):1889-93.
40. Khanolkar AD, Abadji V, Lin S, Hill WA, Taha G, Abouzid K, et al. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem* 1996;39(22):4515-9.

41. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991;11(2):563-83.
42. Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(10):5780-5.
43. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 1998;265(1410):2081-5.
44. Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 1998;51(3):391-402.
45. Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998;83(2):393-411.
46. Abood ME, Martin BR. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13(5):201-6.
47. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 2001;410(6828):588-92.
48. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006;78(6):549-63.
49. Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997;77(2):299-318.
50. Biegon A, Kerman IA. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage* 2001;14(6):1463-8.
51. Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, et al. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 2000;100(4):797-804.
52. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, et al. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 1996;393(2-3):231-5.
53. Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, et al. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256(2):377-80.
54. Elphick MR, Egertova M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356(1407):381-408.



55. Howlett AC. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* 2004;142(8):1209-18.
56. Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 2004;53(4):208-13.
57. Kalant H. Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag* 2001;6(2):80-91.
58. Kim D, Thayer SA. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 2001;21(10):RC146.
59. Παναγής Γ. Κανναβινοειδή, εγκέφαλος και συμπεριφορά, Επιστημονική Επετηρίδα Τμήματος Ψυχολογίας Παν/μίου Κρήτης 2004;1:177-197
60. Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, et al. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci* 2006;26(5):1551-61.
61. Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, et al. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(25):8760-5.
62. Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, et al. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19115-20.
63. Gomez M, Hernandez ML, Pazos MR, Tolon RM, Romero J, Fernandez-Ruiz J. Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance. *Neuroscience* 2008;153(3):687-99.
64. Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci* 2008;38(1):89-97.
65. Tagliaferro P, Javier Ramos A, Onaivi ES, Evrard SG, Lujilde J, Brusco A. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Brain Res* 2006;1085(1):163-76.
66. Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 2002;68(4):247-86.
67. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003;83(3):1017-66.
68. Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(11):565-72.

- 
69. Takahashi KA, Castillo PE. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience* 2006;139(3):795-802.
70. Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA, Kendall DA. Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 1997;69(3):1131-7.
71. Schlicker E, Timm J, Zentner J, Gothert M. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;356(5):583-9.
72. Gessa GL, Mascia MS, Casu MA, Carta G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol* 1997;327(1):R1-2.
73. Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, et al. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 1999;19(11):4544-58.
74. Terranova JP, Michaud JC, Le Fur G, Soubrie P. Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;352(5):576-9.
75. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997;388(6644):773-8.
76. Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993;16(12):521-7.
77. Misner DL, Sullivan JM. Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 1999;19(16):6795-805.
78. Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, et al. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;60(2):169-73.
79. Khaspekov LG, Brenz Verca MS, Frumkina LE, Hermann H, Marsicano G, Lutz B. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2004;19(7):1691-8.
80. Jackson SJ, Pryce G, Diemel LT, Cuzner ML, Baker D. Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation. *Neuroscience* 2005;134(1):261-8.



81. Croxford JL, Pryce G, Jackson SJ, Ledent C, Giovannoni G, Pertwee RG, et al. Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008;193(1-2):120-9.
82. Alger BE. Endocannabinoids and their implications for epilepsy. *Epilepsy Curr* 2004;4(5):169-73.
83. de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ortega-Gutierrez S, Cabranes A, Pryce G, Baker D, et al. UCM707, an inhibitor of the anandamide uptake, behaves as a symptom control agent in models of Huntington's disease and multiple sclerosis, but fails to delay/arrest the progression of different motor-related disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006;16(1):7-18.
84. Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005;19(1-2):96-107.
85. van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med* 2005;7(1-2):37-50.
86. Baddeley AD. Working memory. Clarendon Press, 1986. Oxford.
87. Miller LL, Branconnier RJ. Cannabis: effects on memory and the cholinergic limbic system. *Psychol Bull* 1983;93(3):441-56.
88. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci* 1999;65(6-7):715-23.
89. Varvel SA, Hamm RJ, Martin BR, Lichtman AH. Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;157(2):142-50.
90. Ranganathan M, D'Souza DC. The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;188(4):425-44.
91. Battisti RA, Roodenrys S, Johnstone SJ, Respondek C, Hermens DF, Solowij N. Chronic use of cannabis and poor neural efficiency in verbal memory ability. *Psychopharmacology (Berl)*;209(4):319-30.
92. Davies SN, Pertwee RG, Riedel G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2002;42(8):993-1007.
93. Aigner TG. Delta-9-tetrahydrocannabinol impairs visual recognition memory but not discrimination learning in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 1988;95(4):507-11.
94. Da S, Takahashi RN. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26(2):321-5.

95. Wise LE, Thorpe AJ, Lichtman AH. Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(9):2072-80.
96. Kosiorek P, Hryniewicz A, Bialuk I, Zawadzka A, Winnicka MM. Cannabinoids alter recognition memory in rats. *Pol J Pharmacol* 2003;55(5):903-10.
- 96b. Nawata Y, Hiranita T, Yamamoto T. A cannabinoid CB(1) receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*;35(2):515-20.
97. DeSanty KP, Dar MS. Cannabinoid-induced motor incoordination through the cerebellar CB(1) receptor in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;69(1-2):251-9.
98. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 1998;5(6 Pt B):483-501.
99. Smiley A. Marijuana: On-Road and Driving-Simulator Studies. In: H. Kalant et al. (Eds) *The Health Effects of Cannabis*. Toronto: Center for Addiction and Mental Health 1999;173-191.
100. Yesavage JA, Leirer VO, Denari M, Hollister LE. Carry-over effects of marijuana intoxication on aircraft pilot performance: a preliminary report. *Am J Psychiatry* 1985;142(11):1325-9.
101. Sanudo-Pena MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol* 2000;391(3):269-74.
102. Romero J, Lastres-Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther* 2002;95(2):137-52.
103. Curtis A, Rickards H. Nabilone could treat chorea and irritability in Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2006;18(4):553-4.
104. Consroe P, Sandyk R, Snider SR. Open label evaluation of cannabidiol in dystonic movement disorders. *Int J Neurosci* 1986;30(4):277-82.
105. Muller-Vahl KR, Schneider U, Prevedel H, Theloe K, Kolbe H, Daldrup T, et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *J Clin Psychiatry* 2003;64(4):459-65.
106. Goutopoulos A, Makriyannis A. From cannabis to cannabinergics: new therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* 2002;95(2):103-17.
107. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):8268-73.

108. Reddy PH, Williams M, Tagle DA. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* 1999;22(6):248-55.
109. Consroe P, Musty R, Rein J, Tillery W, Pertwee R. The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1997;38(1):44-8.
110. Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Mol Neurobiol* 2007;36(1):45-59.
111. Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, et al. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;362(9395):1517-26.
112. Zajicek JP, Sanders HP, Wright DE, Vickery PJ, Ingram WM, Reilly SM, et al. Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(12):1664-9.
113. Raft D, Gregg J, Ghia J, Harris L. Effects of intravenous tetrahydrocannabinol on experimental and surgical pain. Psychological correlates of the analgesic response. *Clin Pharmacol Ther* 1977;21(1):26-33.
114. Noyes R, Jr., Brunk SF, Avery DA, Canter AC. The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther* 1975;18(1):84-9.
115. Holdcroft A, Smith M, Jacklin A, Hodgson H, Smith B, Newton M, et al. Pain relief with oral cannabinoids in familial Mediterranean fever. *Anaesthesia* 1997;52(5):483-6.
116. Walker JM, Hohmann AG, Martin WJ, Strangman NM, Huang SM, Tsou K. The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci* 1999;65(6-7):665-73.
117. Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 1998;395(6700):381-3.
118. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998;394(6690):277-81.
119. Mattes RD, Engelman K, Shaw LM, Elsohly MA. Cannabinoids and appetite stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49(1):187-95.
120. Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 1995 Feb;10(2):89-97.
121. Mechoulam R, Hanus L, Fride E. Towards cannabinoid drugs--revisited. *Prog Med Chem* 1998;35:199-243.
122. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;143(3):315-7.



123. Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci* 1998;63(8):PL113-7.
124. Lucas VS, Jr., Laszlo J. delta 9-Tetrahydrocannabinol for refractory vomiting induced by cancer chemotherapy. *Jama* 1980;243(12):1241-3.
125. Orr LE, McKernan JF, Bloome B. Antiemetic effect of tetrahydrocannabinol. Compared with placebo and prochlorperazine in chemotherapy-associated nausea and emesis. *Arch Intern Med* 1980;140(11):1431-3.
126. Tramer MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *Bmj* 2001;323(7303):16-21.
127. Darmani NA. The potent emetogenic effects of the endocannabinoid, 2-AG (2-arachidonoylglycerol) are blocked by delta(9)-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300(1):34-42.
128. Darmani NA. Delta(9)-tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids prevent emesis produced by the cannabinoid CB(1) receptor antagonist/inverse agonist SR 141716A. *Neuropsychopharmacology* 2001;24(2):198-203.
129. Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain* 2003;126(Pt 6):1252-70.
130. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14(3):311-7.
131. Heuss C, Gerber U. G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 2000;23(10):469-75.
132. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):639-50.
133. Lefkowitz RJ. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(8):413-22.
134. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80(2):249-57.
135. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 2006;1(8):761-82.
136. Oude Weernink PA, Han L, Jakobs KH, Schmidt M. Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(4):888-900.
137. Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(9):3825-9.
138. Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in

- AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995;15(10):6552-61.
139. Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, et al. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1993;1(2):121-34.
140. Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 1999;56(6):1362-9.
141. Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997;17(14):5327-33.
142. Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287(3):884-8.
143. Hampson RE, Mu J, Deadwyler SA. Cannabinoid and kappa opioid receptors reduce potassium K current via activation of G(s) proteins in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 2000;84(5):2356-64.
144. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(1):1-13.
145. McIntosh BT, Hudson B, Yegorova S, Jollimore CA, Kelly ME. Agonist-dependent cannabinoid receptor signalling in human trabecular meshwork cells. *Br J Pharmacol* 2007;152(7):1111-20.
146. Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, et al. 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229(1):58-64.
147. Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19144-9.
148. De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, et al. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res* 2007;313(14):2993-3004.
149. Sanchez C, Rueda D, Segui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzman M. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* 2001;59(5):955-9.
150. Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1997;322 ( Pt 1):1-18.

151. Harkany T, Guzman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(2):83-92.
152. Wu DF, Yang LQ, Goschke A, Stumm R, Brandenburg LO, Liang YJ, et al. Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J Neurochem* 2008;104(4):1132-43.
153. Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N, Devi LA. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* 2001;79(5-6):226-42.
154. Rios C, Gomes I, Devi LA. mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 2006;148(4):387-95.
155. Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids* 2002;121(1-2):83-9.
156. Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem* 1999;274(5):2794-801.
157. Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 1986;29(3):307-13.
158. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(16):7656-60.
159. Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* 1995;375(1-2):143-7.
160. Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1998;1(7):595-601.
161. Kavalali ET, Klingauf J, Tsien RW. Activity-dependent regulation of synaptic clustering in a hippocampal culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12893-900.
162. Ma L, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA. Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. *Nat Neurosci* 1999;2(1):24-30.
163. Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer



- formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 2005;67(5):1697-704.
164. Derkinderen P, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano JC, de Franciscis V, et al. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* 1996;273(5282):1719-22.
165. Derkinderen P, Toutant M, Kadare G, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem* 2001;276(41):38289-96.
166. Ridyard MS, Sanders EJ. Inhibition of focal adhesion kinase expression correlates with changes in the cytoskeleton but not apoptosis in primary cultures of chick embryo cells. *Cell Biol Int* 2001;25(3):215-26.
167. Henry DJ, Chavkin C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 1995;186(2-3):91-4.
168. McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(2):618-26.
169. Guo J, Ikeda SR. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 2004;65(3):665-74.
170. Garcia DE, Brown S, Hille B, Mackie K. Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1998;18(8):2834-41.
171. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 2):H2085-93.
172. Endoh T. Pharmacological characterization of inhibitory effects of postsynaptic opioid and cannabinoid receptors on calcium currents in neonatal rat nucleus tractus solitarius. *Br J Pharmacol* 2006;147(4):391-401.
173. Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;101(1-2):93-102.
174. Brown SP, Safo PK, Regehr WG. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci* 2004;24(24):5623-31.
175. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2005(168):53-79.

176. Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 1996;16(14):4322-34.
177. Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*;44(2):75-85.
178. Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Koovor A, et al. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 1999;19(10):3773-80.
179. Kouznetsova M, Kelley B, Shen M, Thayer SA. Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 2002;61(3):477-85.
180. Breivogel CS, Lambert JM, Gerfin S, Huffman JW, Razdan RK. Sensitivity to delta9-tetrahydrocannabinol is selectively enhanced in beta-arrestin2 -/- mice. *Behav Pharmacol* 2008;19(4):298-307.
181. Daigle TL, Kwok ML, Mackie K. Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism. *J Neurochem* 2008;106(1):70-82.
182. Daigle TL, Kearn CS, Mackie K. Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology* 2008;54(1):36-44.
183. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;283(5402):655-61.
184. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 2000;102(5):635-46.
185. Belcheva MM, Coscia CJ. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* 2002;11(1):34-44.
186. Luttrell DK, Luttrell LM. Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol* 2003;1(2):327-38.
187. Mangoura D, Dawson G. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):2915-9.
188. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996;379(6565):557-60.
189. Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma

- subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1996;271(32):19443-50.
190. Jiang Y, Cypess AM, Muse ED, Wu CR, Unson CG, Merrifield RB, et al. Glucagon receptor activates extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 via cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(18):10102-7.
191. Belcheva MM, Haas PD, Tan Y, Heaton VM, Coscia CJ. The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between mu-opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(3):909-18.
192. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995;312 ( Pt 2):637-41.
193. Galve-Roperh I, Rueda D, Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2002;62(6):1385-92.
194. Davis MI, Ronesi J, Lovinger DM. A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2003;278(49):48973-80.
195. Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. The involvement of VEGF receptors and MAPK in the cannabinoid potentiation of Ca<sup>2+</sup> flux into N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;120(2):138-44.
196. Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, et al. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 2003;23(6):2371-82.
197. Rubino T, Forlani G, Vigano D, Zippel R, Parolaro D. Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci* 2004;25(3):355-62.
198. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, Gomez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzman M. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 2000;6(3):313-9.
199. Sanchez MG, Ruiz-Llorente L, Sanchez AM, Diaz-Laviada I. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 2003;15(9):851-9.
200. Hart S, Fischer OM, Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2004;64(6):1943-50.



201. Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, et al. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:835-40.
202. Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 2000;58(4):814-20.
203. Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, Maccarrone M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J Biol Chem* 2008;283(10):6005-12.
204. Downer EJ, Gowran A, Campbell VA. A comparison of the apoptotic effect of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in the neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Res* 2007;1175:39-47.
205. Rodriguez-Fernandez JL, Rozengurt E. Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 1996;271(44):27895-901.
206. Mangoura D. mu-Opioids activate tyrosine kinase focal adhesion kinase and regulate cortical cytoskeleton proteins cortactin and vinculin in chick embryonic neurons. *J Neurosci Res* 1997;50(3):391-401.
207. Amorino GP, Deeble PD, Parsons SJ. Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene* 2007;26(5):745-56.
208. Eisinger DA, Ammer H. Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. *Cell Signal* 2008 Dec;20(12):2324-31
209. Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, et al. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 1997;272(35):22330-9.
210. Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response. *J Cell Biol* 2003;160(4):481-6.
211. Skaper SD, Kee WJ, Facci L, Macdonald G, Doherty P, Walsh FS. The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects. *J Neurochem* 2000;75(4):1520-7.
212. Rao GN, Delafontaine P, Runge MS. Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270(46):27871-5.

213. Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daaka Y, et al. The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2000;275(13):9572-80.
214. Tsuchioka M, Takebayashi M, Hisaoka K, Maeda N, Nakata Y. Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 2008;106(1):244-57.
215. Pyne NJ, Waters C, Moughal NA, Sami BS, Pyne S. Receptor tyrosine kinase-GPCR signal complexes. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1220-5.
216. Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 2002;296(5574):1821-5.
217. Gotoh N. Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci* 2008;99(7):1319-25.
218. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*;327(5961):46-50.
219. Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K. Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* 2004;5(4):213-30.
220. Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280(13):12212-20.
221. Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(2):128-40.
222. Miller FD, Gauthier AS. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 2007;54(3):357-69.
223. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80(2):179-85.
224. Leondaritis G, Petrikos L, Mangoura D. Regulation of the Ras-GTPase activating protein neurofibromin by C-tail phosphorylation: implications for protein kinase C/Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway signaling and neuronal differentiation. *J Neurochem* 2009;109(2):573-83.
225. Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, Pickering K, Herrup K, Sweatt JD, et al. Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *J Neurosci* 2008;28(27):6983-95.
226. Impey S, Obrietan K, Storm DR. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 1999;23(1):11-4.

227. Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 2001;76(1):1-10.
228. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 2004;116(3):467-79.
229. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(2):205-15.
230. Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, et al. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 1998;21(4):869-83.
231. Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1999;274(32):22569-80.
232. English JD, Sweatt JD. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 1996;271(40):24329-32.
233. Coogan AN, O'Leary DM, O'Connor JJ. P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro. *J Neurophysiol* 1999;81(1):103-10.
234. Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 2000;20(12):4563-72.
235. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1998;1(7):602-9.
236. Shalin SC, Zirrgiebel U, Honsa KJ, Julien JP, Miller FD, Kaplan DR, et al. Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J Neurosci Res* 2004;75(6):760-70.
237. Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* 1999;6(5):478-90.
238. Maj PF, Collu M, Fadda P, Cattaneo A, Racagni G, Riva MA. Long-term reduction of brain-derived neurotrophic factor levels and signaling impairment following prenatal treatment with the cannabinoid receptor 1 receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinyl-methyl) pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone. *Eur J Neurosci* 2007;25(11):3305-11.
239. Lin HC, Mao SC, Su CL, Gean PW. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cereb Cortex* 2009;19(1):165-75.



240. Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding. *J Neurosci* 1986;6(1):199-207.
241. Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, Takashima S, Mihara B. Autoradiographic analysis on second-messenger systems and local cerebral blood flow in ischemic gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11(2):283-91.
242. Hillard CJ, Auchampach JA. In vitro activation of brain protein kinase C by the cannabinoids. *Biochim Biophys Acta* 1994;1220(2):163-70.
243. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995;270(48):28495-8.
244. Sun MK, Alkon DL. Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch Pharm (Weinheim)* 2009;342(12):689-98.
245. Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol* 1996;132(1-2):77-90.
246. Zeidman R, Troller U, Raghunath A, Pahlman S, Larsson C. Protein kinase Cepsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* 2002;13(1):12-24.
247. Stevens CF, Sullivan JM. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 1998;21(4):885-93.
248. Pilpel Y, Segal M. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci* 2004;19(12):3151-64.
249. Li MX, Jia M, Yang LX, Jiang H, Lanuza MA, Gonzalez CM, et al. The role of the theta isoform of protein kinase C (PKC) in activity-dependent synapse elimination: evidence from the PKC theta knock-out mouse in vivo and in vitro. *J Neurosci* 2004;24(15):3762-9.
250. Sun MK, Alkon DL. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression. *Eur J Pharmacol* 2005;512(1):43-51.
251. Olds JL, Anderson ML, McPhie DL, Staten LD, Alkon DL. Imaging of memory-specific changes in the distribution of protein kinase C in the hippocampus. *Science* 1989;245(4920):866-9.
252. Wang HY, Pisano MR, Friedman E. Attenuated protein kinase C activity and translocation in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 1994;15(3):293-8.
253. Birnbaum SG, Yuan PX, Wang M, Vijayraghavan S, Bloom AK, Davis DJ, et al. Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. *Science* 2004;306(5697):882-4.

254. Hyatt SL, Klauck T, Jaken S. Protein kinase C is localized in focal contacts of normal but not transformed fibroblasts. *Mol Carcinog* 1990;3(2):45-53.
255. Jaken S. Protein kinase C and tumor promoters. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2(2):192-7.
256. Allen LA, Aderem A. Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *Embo J* 1995;14(6):1109-21.
257. Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Naim AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992;356(6370):618-22.
258. Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* 2000;149(7):1455-72.
259. Mangoura D, Sogos V, Dawson G. Protein kinase C-epsilon is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system. *J Neurosci Res* 1993;35(5):488-98.
260. Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, et al. Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene* 2006;25(5):735-45.
261. Shirai Y, Adachi N, Saito N. Protein kinase Cepsilon: function in neurons. *FEBS J* 2008;275(16):3988-94.
262. Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K, Tanaka C. Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Res* 1993;607(1-2):241-8.
263. Hundle B, McMahon T, Dadgar J, Messing RO. Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1995; 15;270(50):30134-40.
264. Zeidman R, Lofgren B, Pahlman S, Larsson C. PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 1999;145(4):713-26.
265. Kasahara K, Kikkawa U. Distinct effects of saturated fatty acids on protein kinase C subspecies. *J Biochem* 1995;117(3):648-53.
266. Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 2004;41(3):405-15.
267. Choi DS, Wang D, Yu GQ, Zhu G, Kharazia VN, Paredes JP, et al. PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid

- plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(21):8215-20.
268. Squire LR, Ojemann JG, Miezin FM, Petersen SE, Videen TO, Raichle ME. Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(5):1837-41.
269. Petrides M, Alivisatos B, Meyer E, Evans AC. Functional activation of the human frontal cortex during the performance of verbal working memory tasks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(3):878-82.
270. Curtis CE, Zald DH, Lee JT, Pardo JV. Object and spatial alternation tasks with minimal delays activate the right anterior hippocampus proper in humans. *Neuroreport* 2000;11(10):2203-7.
271. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Vaccarino V, Charney DS. Deficits in hippocampal and anterior cingulate functioning during verbal declarative memory encoding in midlife major depression. *Am J Psychiatry* 2004;161(4):637-45.
272. Inoue M, Mikami A, Ando I, Tsukada H. Functional brain mapping of the macaque related to spatial working memory as revealed by PET. *Cereb Cortex* 2004;14(1):106-19.
273. Takahashi H, Kato M, Hayashi M, Okubo Y, Takano A, Ito H, et al. Memory and frontal lobe functions; possible relations with dopamine D2 receptors in the hippocampus. *Neuroimage* 2007;34(4):1643-9.
274. Schnider A, Treyer V, Buck A. Selection of currently relevant memories by the human posterior medial orbitofrontal cortex. *J Neurosci* 2000;20(15):5880-4.
275. Schacter DL, Dodson CS. Misattribution, false recognition and the sins of memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356(1413):1385-93.
276. Nyberg L, McIntosh AR, Cabeza R, Habib R, Houle S, Tulving E. General and specific brain regions involved in encoding and retrieval of events: what, where, and when. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):11280-5.
277. Sybirska E, Davachi L, Goldman-Rakic PS. Prominence of direct entorhinal-CA1 pathway activation in sensorimotor and cognitive tasks revealed by 2-DG functional mapping in nonhuman primate. *J Neurosci* 2000;20(15):5827-34.
278. McIntosh AR, Gonzalez-Lima F. Network interactions among limbic cortices, basal forebrain, and cerebellum differentiate a tone conditioned as a Pavlovian excitator or inhibitor: fluorodeoxyglucose mapping and covariance structural modeling. *J Neurophysiol* 1994;72(4):1717-33.
279. Roivainen A, Tolvanen T, Salomaki S, Lendvai G, Velikyan I, Numminen P, et al. 68Ga-labeled oligonucleotides for in vivo imaging with PET. *J Nucl Med* 2004;45(2):347-55.



280. Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME, Cherry SR. In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol* 2000;18(6):655-60.
281. Jang DP, Lee SH, Lee SY, Park CW, Cho ZH, Kim YB. Neural responses of rats in the forced swimming test: [F-18]FDG micro PET study. *Behav Brain Res* 2009;203(1):43-7.
282. He TT, Zhang JM, Wang RM, Yao SL, Tian JH. [Application of positron emission tomography in evaluation of Alzheimer's disease rat model]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*;90(13):924-7.
283. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988;31(1):47-59.
284. Pitsikas N, Rigamonti AE, Bonomo SM, Cella SG, Muller EE. Molsidomine antagonizes L-NAME-induced acquisition deficits in a recognition memory task in the rat. *Pharmacol Res* 2003;47(4):311-5.
285. Leterrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z. Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem* 2004;279(34):36013-21.
286. Soh JW, Weinstein IB. Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes. *J Biol Chem* 2003;278(36):34709-16.
287. Cheng Y, Leung S, Mangoura D. Transient suppression of cortactin ectopically induces large telencephalic neurons towards a GABAergic phenotype. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 18):3161-72.
288. Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;307(3):331-8.
289. Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, et al. Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ Res* 2000;86(11):1173-9.
290. Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* 2005;46(5):1061-7.
291. Asimaki O, Mangoura D. Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKCvarepsilon, Src, and Fyn in primary neurons. *Neurochem Int* 2011;58(2):135-44.
292. Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(5):181-7.
293. He Z, Cho YY, Ma WY, Choi HS, Bode AM, Dong Z. Regulation of ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 by Fyn kinase. *J Biol Chem* 2005;280(4):2446-54.

294. Song C, Vondriska TM, Wang GW, Klein JB, Cao X, Zhang J, et al. Molecular conformation dictates signaling module formation: example of PKCepsilon and Src tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(3):H1166-71.
295. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J* 1997;16(23):7032-44.
296. Asimaki O, Leondaritis G, Lois G, Sakellaris N, Mangoura D. Cannabinoid 1 receptor-dependent transactivation of fibroblast growth factor receptor 1 emanates from lipid rafts and amplifies extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in embryonic cortical neurons. *J Neurochem* 2011.
297. Furdui CM, Lew ED, Schlessinger J, Anderson KS. Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell* 2006;21(5):711-7.
298. Sandilands E, Akbarzadeh S, Vecchione A, McEwan DG, Frame MC, Heath JK. Src kinase modulates the activation, transport and signalling dynamics of fibroblast growth factor receptors. *EMBO Rep* 2007;8(12):1162-9.
299. Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 1995;359(2-3):133-6.
300. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, et al. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992;267(28):20293-7.
301. Venkatakrishnan G, Salgia R, Groopman JE. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2000;275(10):6868-75.
302. Wu HW, Li HF, Wu XY, Zhao J, Guo J. Reactive oxygen species mediate ERK activation through different Raf-1-dependent signaling pathways following cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2008;432(2):83-7.
303. Cheng Y, Zhizhin I, Perlman RL, Mangoura D. Prolactin-induced cell proliferation in PC12 cells depends on JNK but not ERK activation. *J Biol Chem* 2000;275(30):23326-32.
304. Wallace MJ, Newton PM, McMahon T, Connolly J, Huibers A, Whistler J, et al. PKCepsilon regulates behavioral sensitivity, binding and tolerance to the CB1 receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(7):1733-42.
305. Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* 1993;268(7):4573-6.
306. Korzh A, Keren O, Gafni M, Bar-Josef H, Sarne Y. Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell. *Brain Res* 2008;1189:23-32.

307. Gatlin JC, Estrada-Bernal A, Sanford SD, Pfenninger KH. Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation regulates growth cone adhesion and pathfinding. *Mol Biol Cell* 2006;17(12):5115-30.
308. Solomon RO, Apkhazava D, Nozadze M, Jackson AP, McCabe BJ, Horn G. Different forms of MARCKS protein are involved in memory formation in the learning process of imprinting. *Exp Brain Res* 2008;188(2):323-30.
309. Elia LP, Yamamoto M, Zang K, Reichardt LF. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron* 2006;51(1):43-56.
310. Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(23):13438-43.
311. Rybin VO, Guo J, Gertsberg Z, Elouardighi H, Steinberg SF. Protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) and Src control PKCdelta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2007;282(32):23631-8.
312. Ellis J, Padiani JD, Canals M, Milasta S, Milligan G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 2006;281(50):38812-24.
313. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):139-49.
314. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov*;9(5):373-86.
315. Messina S, Onofri F, Bongiorno-Borbone L, Giovedi S, Valtorta F, Girault JA, et al. Specific interactions of neuronal focal adhesion kinase isoforms with Src kinases and amphiphysin. *J Neurochem* 2003;84(2):253-65.
316. Leontiadis LJ, Papakonstantinou MP, Georgoussi Z. Regulator of G protein signaling 4 confers selectivity to specific G proteins to modulate mu- and delta-opioid receptor signaling. *Cell Signal* 2009;21(7):1218-28.
317. Di Pasquale E, Chahinian H, Sanchez P, Fantini J. The insertion and transport of anandamide in synthetic lipid membranes are both cholesterol-dependent. *PLoS One* 2009;4(3):e4989.
318. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973;33(11):2643-5.
319. Mangoura D, Sakellaris N, Vernadakis A. Cholinergic neurons in cultures derived from three, six and eight-day-old chick embryo: a biochemical and immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 1988; 40: 37-46.



## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο	Όλγα Ασημάκη
Τόπος Γέννησης	Αθήνα
Υπηκοότητα	Ελληνική
Οικογενειακή Κατάσταση	Έγγαμη
Διεύθυνση Κατοικίας	Θεσσαλίας 57, Βούλα, 16673
E-Mail	olga.asimaki@gmail.com

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2006 - Σήμερα	Υποψήφια Διδάκτωρ του Τομέα Βασικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
2007 - 2009	Διετής Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση στη «Διάγνωση και Θεραπεία Ψυχοσεξουαλικών Διαταραχών», Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής (ΕΠΙΨΥ), Αθήνα.
2004 - 2005	MSc στις Νευροεπιστήμες, Institute of Psychiatry, King's College London.
2000 - 2004	Πτυχίο Ψυχολογίας, Κατεύθυνση Νευροψυχολογίας, Πάντειο Πανεπιστήμιο.
2000	Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου από το Α' Αρσάκειο Ψυχικού με γενικό βαθμό «Άριστα» και διαγωγή Κοσμιότητα.

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2006 - 2011	Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) με θέμα «Διερεύνηση της δράσης της PKCε στη λειτουργική μνήμη του επίμου με ποζιτρονική τομογραφία» υπό την επίβλεψη της Δρ. Δ. Μάγκουρα και του Καθηγητή Ν. Σακελλαρίδη.
2008 - 2009	Εκπαιδευόμενη Ψυχολόγος στα Εξωτερικά Ιατρεία του Αιγινήτειου Νοσοκομείου.
2004 - 2005	Εκπόνηση Μεταπτυχιακής Εργασίας με Θέμα: «Global and ventricular cerebrospinal fluid measures as a marker of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease», Institute of Psychiatry at the Maudsley Hospital, London.
2003 - 2004	Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας με Θέμα: «Ψυχολογικές Διακυμάνσεις και Ψυχιατρικές Διαταραχές Ασθενών που έχουν Υποστεί Εγκεφαλικό Τραυματισμό» στο Νοσοκομείο Ευαγγελισμός.
2003 - 2004	Ασκούμενη Ψυχολόγος στο Ελληνικό Κέντρο Διαπολιτισμικής Ψυχιατρικής και Περίθαλψης, Αθήνα.

2003 - 2004      Απασχόληση στη Διεύθυνση Οργάνωσης και Εκπαίδευσης του Υπουργείου Οικονομικών, Γενική Διεύθυνση Διοικητικής Υποστήριξης.

### **ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

2008 - 2010      Συμμετοχή στην επίβλεψη εκπόνησης πτυχιακής εργασίας φοιτητών του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

**Asimaki, O.** and Mangoura, D. (2011) Cannabinoid Receptor 1 induces a Biphasic ERK Activation via Multiprotein Signaling Complexes of Proximal Kinase PKCε, Src, and Fyn in Primary Neurons. *Neurochem Int*, 58(2):135-44.

**Asimaki, O.**, Leondaritis, G., Lois, G., Sakellaridis, N. and Mangoura D. (2011) Cannabinoid 1 receptor-dependent transactivation of fibroblast growth factor receptor 1 emanates from lipid rafts and amplifies extracellular signal regulated kinase 1/2 activation in embryonic cortical neurons. *J Neurochem*, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07030.x.

Leondaritis, G., Karouzaki, S., **Asimaki, O.**, Tsirimonaki, E., Florakis, A., Vougas, K., Papadopoulou, A., Tsangaris, G., Mangoura D. (2011) Mouse embryonic stem cells possess distinct lipid rafts and an elaborate lipid raft-associated cortical cytoskeleton machinery, Submitted.

### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Doxakis, E., **Asimaki, O.**, Tsirimonaki, E., and Mangoura, D. Functional allosteric regulation of GRD by CSRD in PNS neurons. Proc. Children's Tumour Foundation International Neurofibromatosis Consortium, p.67, 2006.
2. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor EGFR by CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor Agonists. 8<sup>th</sup> Symposium of the Hellenic Society of Pharmacology, p17-18, Athens, 2007. *\*abstract received 1<sup>st</sup> Prize for Graduate Students.*
3. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor agonists induce CB<sub>1</sub> receptor enrichment in lipid rafts. Trans. 21<sup>st</sup> Meeting, Hellenic Society for Neuroscience, 21:60-1, Thessaloniki, 2007.
4. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. CB<sub>1</sub>R-dependent activation of Fyn tyrosine kinase and Protein Kinase C Delta, PKCδ, in lipid rafts. Hellenic Society of Pharmacology, Athens, 2008.

5. **Asimaki, O.**, Tsirimonaki, E., Sakellaridis, N. and Mangoura, D. Cannabinoids activate PKC $\epsilon$ -dependent phosphorylation of MARCKS. 22<sup>nd</sup> Meeting, Hellenic Society for Neuroscience, p118, Athens, 2008. \*Session: Neural Development; Poster presentation received "Markos Tsakopoulos" Prize
6. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. CB1R-induced activation of Fyn tyrosine kinase and Protein Kinase C Delta in lipid rafts. Soc. Neurosci. Abs. Session: *G-protein Linked Receptors II*, 808.2, Washington, 2008. \*oral presentation
7. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. Intermolecular interaction of cannabinoid receptor 1 (CB1R) and fibroblast growth factor receptor (FGFR) in neuronal lipid rafts. 23<sup>rd</sup> Meeting, Hellenic Society for Neuroscience, Rhodes, 2009.
8. **Asimaki, O.**, Sakellaridis, N. and Mangoura, D. CB1R signaling emanates from lipid rafts. Soc. Neurosci. Abs. Session: *Cannabinoids: Neural Mechanisms of Tolerance Dependence and Addiction*, Chicago, 2009.
9. Fedonidis C., Koliou X., Stergiopoulos C., **Asimaki O.**, Alexakis N., Mangoura D. Ghrelin hormone regulates body weight in a rat obesity model. Symposium of Hellenic Society for Neuroscience, 2010. \*Poster presentation received HSN Prize
10. **Asimaki O.**, Sakellaridis N., Mangoura D. CB1R proximal signaling in CNS neurons. Soc. Neurosci. Abs. Session: *Cannabinoids: Developmental Effects*, 2010.
11. Fedonidis C., Koliou X., Stergiopoulos C., **Asimaki O.**, Albanopoulos K., Leandros E., Alexakis N. and Mangoura D. Sleeve gastrectomy induces weight loss and long-term molecular changes in the gut-brain axis in a rat obesity model. 27<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, 2010.

### ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

2008	Βραβείο «Μάρκος Τσακόπουλος» στον Τομέα της «Νευρωνικής Ανάπτυξης» από την Ελληνική Εταιρεία Νευροεπιστημών για την επιστημονική εργασία με τίτλο «Cannabinoids activate PKC $\epsilon$ -dependent phosphorylation of MARCKS».
2007	1 <sup>o</sup> Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης από την Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας για την επιστημονική εργασία με τίτλο «Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor EGFR by CB1 Cannabinoid Receptor Agonists».
2006 - 2009	Υποτροφία ΠΕΝΕΔ για Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής.



### **ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ**

- Άριστη γνώση Αγγλικών.
- Άριστη γνώση Η/Υ.
- Πτυχία Πιάνου, Ειδικού Αρμονίας, Ανώτερων Θεωρητικών, Φούγκας, και Σύγχρονου Τραγουδιού.